



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA DE
Aristeguietia glutinosa EN RATONES *Mus musculus*”.**

Trabajo de Titulación

Tipo: Proyecto de Investigación

Presentado para optar por el grado académico de:

BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

AUTOR/ES: JOSÉ DAVID ANDRADE CÁCERES

MARCO ANDRÉS MURILLO MALA

DIRECTOR: BQF. JOHN MARCOS QUISPILLO

Riobamba – Ecuador

2019

© 2019, José David Andrade Cáceres y Marco Andrés Murillo Mala

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho de Autor

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

CARRERA DE BIOQUIMICA Y FARMACIA

El Tribunal del trabajo de titulación certifica que: El trabajo de titulación: Tipo: Proyecto de Investigación, **Evaluación de la actividad antiinflamatoria de *Aristeguietia glutinosa* en ratones *Mus musculus***, realizado por los señores: JOSÉ DAVID ANDRADE CÁCERES y MARCO ANDRÉS MURILLO MALA, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal del trabajo de titulación, El mismo que cumple con los requisitos científicos, técnicos, legales, en tal virtud el Tribunal Autoriza su presentación.

FIRMA

FECHA

BQF. John Marcos Quispillo Moyota

DIRECTOR DEL TRABAJO

DE TITULACION

BQF. Gisela Pilco Bonilla M.Sc.

MIEMBRO DE TRIBUNAL

Nosotros, José David Andrade Cáceres y Marco Andrés Murillo Mala, declaramos que el presente trabajo de titulación es de nuestra autoría y los resultados del mismo son auténticos. Los textos en el documento que provienen de otras fuentes están debidamente citados y referenciados.

Como autores asumimos la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este trabajo de titulación; El patrimonio intelectual pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo

Riobamba, 16 de octubre del 2019.

José David Andrade Cáceres

CI: 060412417-2

Marco Andrés Murillo Mala

CI: 080401947-9

DEDICATORIA

El trabajo de titulación va dedicado a mis padres, abuelitos, hermanos, esposa, hija, suegros, abuelita política, tíos políticos que siempre me han brindado apoyo incondicional al largo de toda mi vida y así llegar a culminar mi carrera.

José

El trabajo de titulación va dedicado a mis padres, hermanas, sobrinos y mi padrino que siempre me han brindado apoyo incondicional al largo de toda mi vida y así llegar a culminar mi carrera.

Marco

AGRADECIMIENTO

Quiero agradecer primero a Dios por brindarme su amor y sabiduría en todo momento, a mis padres José y Sandra que han estado en todos los momentos de mi vida brindándome su apoyo incondicional.

A mis hermanos Sebastián, Valeria, Priscila y Jonathan, como también mis cuñados Nandy y Carlitos quienes ya son profesionales y fueron quienes me impulsaron a que deba terminar mi carrera.

A mi abuelita Carmen quien con su amor y apoyo nunca me ha dejado de caer.

A mi compañera de toda la vida Anahela quien siempre estuvo con todo su amor y cariño ahí alentándome, apoyándome en todo momento para no caer y realizar todo de la mejor manera.

A mi hija Ariadne quien fue el motor primordial para culminar rápido mis estudios.

A mis suegros Gustavo y Mónica quienes siempre están apoyándome de manera incondicional.

Y como no agradecerles a nuestros mentores John, Irvin y Gaby quienes estuvieron cada momento de este trabajo de titulación brindándome su conocimiento, amistad y apoyo en todo momento.

A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo por brindarnos la oportunidad de formarme como profesional y don de gente.

A la Universidad Regional Autónoma de los Andes por darnos la apertura en el laboratorio de Biología Molecular para realizar parte de las pruebas de nuestra investigación.

José David Andrade Cáceres

Quiero Agradecer a mis padres Pedro y Rosa por ser los mentores e impulsaroes para haber logrado este sueño de culminar mi carrera universitaria.

A mis hermanas Diana, Marianela y Fernanda por impulsarme y apoyarme en cada uno de los momentos difíciles de mi carrera.

A mis sobrinos Mathias y Suleyka por ser mis motores a seguir adelante.

A mi padrino Victor por apoyarme cada momento de mi vida.

A mi compañero de tesis y hermano José Quien me apoyo en cada momento para poder culminar mi carrera.

Marco Andrés Murillo Mala

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

AGDCMMM Diclorometano-metanol de *Aristeguietia glutinosa*

DCMMM Diclorometano-metanol

EAG Equivalentes de ácido gálico

EQ Equivalentes de quercetina

mg Miligramo

um Micrómetro

Kg Kilogramo

R² Coeficiente de correlación

m.s.n.m. Metros sobre el nivel del mar

s.c. Subcutáneo

ml Mililitro

U.V. Radiación Ultravioleta

TABLA DE CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS.....	xi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xii
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	xiii
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xiv
RESUMEN.....	xv
SUMMARY	xvi
INTRODUCCIÓN	1

CAPITULO I

1. MARCO TEORICO REFERENCIAL	2
1.1. Inflamación.....	2
1.1.1. Fases de la Inflamación	3
1.1.2. Clasificación de la Inflamación.....	4
1.2. Biodiversidad del Ecuador	5
1.2.1. Plantas medicinales.....	6
1.2.1.1. Plantas con actividad antiinflamatoria	7
1.2.1.2. Metabolitos secundarios con propiedades antiinflamatorias.....	7
1.2.2. Aristeguietia glutinosa (Matico)	8
1.2.2.1. Aspectos Taxonómicos	8
1.2.2.2. Descripción botánica	9
1.2.2.3. Propiedades y usos.....	9
1.2.2.4. Fitoquímica.....	10
1.3. Animales de Laboratorio Ratones <i>Mus musculus</i>	10
1.3.1. TAXONOMÍA	11
1.3.2. Ventajas de su uso como animal de laboratorio.....	11

1.3.3. Desventajas.....	11
1.4. Bases conceptuales	11

CAPITULO II

2. MARCO METODOLOGICO.....	14
2.1. Población de estudio	14
2.2. Tamaño de la Muestra.....	14
2.3. Lugar de la investigación	14
2.4. Equipos, Materiales y Reactivos.....	14
2.4.1. Equipos	14
2.4.2. Materiales	15
2.4.3. Reactivos.....	17
2.5. Selección de la planta.....	19
2.6. Recolección de la planta	19
2.7. Preparación de la muestra	20
2.7.1. Control de calidad de la droga cruda	20
2.7.1.1. Parámetros físicos.....	20
2.8. Obtención de extractos	23
2.9. Tamizaje fitoquímico.....	25
2.10. Cuantificación de Fenoles y Flavonoides Totales.....	27
2.10.1. Cuantificación de Flavonoides.....	27
2.10.2. Cuantificación de Fenoles	27
2.11. Biomodelos de laboratorio	28
2.11.1. Biomodelos en el bioterio	28
2.11.2. Ambientación de los biomodelos en el bioterio	28
2.12. Preparación del vehículo	29
2.13. Preparación de la carragenina.....	29
2.14. Preparación del control positivo.....	29

2.15. Preparación a distintas concentraciones del extracto.....	29
2.16. Administración de dosis a los ratones <i>Mus musculus</i>	29
2.17. Modelos para generar inflamación.....	30
2.17.1. Modelo de edema plantar inducido por carragenina	30
2.17.1.2. Biometría hemática	30
2.17.2. Modelo de inflamación por air pouch.....	30
2.18. Eutanasia de los ratones	32
2.19. Análisis de datos.....	32
 CAPITULO III	
3. Resultados y discusiones	33
3.1. Control de calidad de la droga vegetal.....	33
3.1.1. Determinación de humedad	33
3.1.2. Contenido de cenizas totales	34
3.1.3. Contenido de cenizas solubles en H ₂ O y cenizas insolubles en HCl	34
3.2. Tamizaje fitoquímico.....	34
3.2.1. Extracto Etanólico	34
3.2.2. Extracto Hexánico	35
3.2.3. Extracto Diclorometano-metanol.....	36
3.3. Cuantificación de fenoles totales y flavonoides totales	37
3.4. Generación de la inflamación	38
3.4.1. Inducción y evaluación del Método de Edema Plantar con carragenina	38
3.4.1.1. Fórmula Leucocitaria.....	41
3.4.2. Inducción y evaluación de la inflamación por Air pouch.....	43
3.4.2.1. Cuantificación de Proteínas Totales.....	44
3.4.2.2. Infiltración leucocitaria.....	45
CONCLUSIONES.....	47
RECOMENDACIONES.....	48

BIBLIOGRAFIA
ANEXOS

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-2: Equipos	14
Tabla 2-2: Materiales	15
Tabla 3-2: Reactivos.....	17
Tabla 4-3: Control de calidad de la droga vegetal	33
Tabla 5-3: Referencias de análisis	34
Tabla 6-3: Extracto etanólico.....	35
Tabla 7-3: Extracto hexánico	36
Tabla 8-3: Extracto Diclorometano-metanol.....	36
Tabla 9-3: Media de los resultados de la disminución de la inflamación.....	39
Tabla 10-3: Porcentaje de inhibición.....	40
Tabla 11-3: Concentraciones-absorbancia	43
Tabla 12-3: Proteínas Totales	45
Tabla 13-3: Infiltración leucocitaria.....	45

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-1: Proceso Tisular De La Inflamación	2
--	----------

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1-3: Media De La Disminución De La Inflamación	40
Gráfico 2-3: Porcentaje De Inhibición	41
Gráfico 3-3: Conteo De Glóbulos Blancos	42
Gráfico 4-3: Plaquetas	43
Gráfico 5-3: Curva Estándar	44
Gráfico 6-3: Proteínas Totales	45
Gráfico 7-3: Infiltración Leucocitaria	46

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO A: Identificación de la planta

ANEXO B: Preparación de la muestra

ANEXO C: Determinación de la humedad

ANEXO D: Determinación de cenizas totales

ANEXO E: Obtención de extractos

ANEXO F: Tamizaje fitoquímico

ANEXO G: Cuantificación de fenoles Totales

ANEXO H: Cuantificación de flavonoides Totales

ANEXO I: Ambientación de los biomodelos en el bioterio

ANEXO J: Preparación del vehículo

ANEXO K: Preparación y administración del extracto

**ANEXO L: Modelo de inflamación inducida por carragenina en la pata trasera del ratón
*Mus musculus***

ANEXO M: Biometría hemática

ANEXO N: Modelo de inflamación por air pouch

ANEXO N: Determinación de proteínas totales

RESUMEN

El objetivo fue evaluar mediante ensayos biológicos “*in vivo*” en ratones *Mus musculus*, la actividad antiinflamatoria del extracto diclorometano-metanol de *Aristeguietia glutinosa* (AGDCMM). La *Aristeguietia glutinosa* de nombre común Matico, el uso tradicional le otorga a las hojas propiedades propias como: cicatrizante, antiséptico, antiinflamatorio, expectorante, antitusígeno, antibacteriana y antifúngica. Una vez recolectado el material vegetal se secó y trituró. Para obtener los extractos, las hojas trituradas se maceraron pesando 300g con etanol al 97% y 500g con hexano, al cabo de 48 horas se refrigeró y filtró, posteriormente se concentró en un rotovapor al vacío bajo condiciones controladas a una temperatura de 40°C para obtener los extractos concentrados, finalmente se utilizó el residuo de material vegetal del extracto hexánico, colocando diclorometano-metanol (1:1) y repitiendo el proceso anterior para obtener un extracto concentrado. Los flavonoides totales fueron medidos espectrofotométricamente a través del método del Tricloruro de Aluminio, obteniendo los siguientes resultados: 16.69 ± 0.031 mg EQ/10mg del extracto diclorometano-metanol, 12.74 ± 0.045 mg EQ/10mg extracto del extracto etanólico y 12.10 ± 0.027 mg EQ/10mg del extracto hexánico de *Aristeguietia glutinosa*. La determinación de fenoles se realizó por el método de Folin-Ciocalteu dando como resultados los siguientes valores: 37.82 ± 0.007 mg EAG/10mg del extracto diclorometano-metanol, extracto 16.80 ± 0.002 mg EAG/10mg del extracto etanólico y 8.98 ± 0.009 mg EAG/10mg del extracto hexánico de *Aristeguietia glutinosa*. El ensayo de actividad antiinflamatoria se llevó a cabo por los métodos de edema plantar y air pouch utilizando carragenina como agente irritante. Como resultado se evidencia que, en ambos métodos, el extracto de AGDCMM produce una reducción de la inflamación observándose un efecto mayor en ratones tratados a la concentración de 30mg/kg. Como conclusión podemos indicar que al menos una de las propiedades benéficas tradicionalmente atribuidas a *Aristeguietia glutinosa* (matico) fue comprobada científicamente, la cual puede deberse a la concentración alta de flavonoides y fenoles que posee.

Palabras Clave: <BIOQUÍMICA>, <FARMACIA>, <MATICO (*Aristeguietia glutinosa*)>, <DICLOROMETANO>, <EXTRACTO FITOQUÍMICOS>, <FITOMEDICAMENTO>, <ANTIINFLAMATORIO>, <EDEMA PLANTAR>, <DICLOFENACO>.

SUMMARY

The objective was to evaluate by biological tests "*in vivo*", in *Mus musculus* mice, the anti-inflammatory activity of the dichloromethane-methanol extract of *Aristeguietia glutinosa* (AGDCMMM). *Aristeguietia glutinosa* whose common name is Matíco, the traditional use gives the leaves their own properties such as: healing, antiseptic, anti-inflammatory, expectorant, antitussive, antibacterial and anti fungal. Once collected the plant material was dried and crushed. To obtain the extracts, the crushed leaves were macerated weighing 300g with 97% ethanol and 500g with hexane, after 48 hours it was refrigerated and filtered, then it was concentrated in a vacuum rotary evaporator under controlled conditions at a temperature of 40 ° C to obtain the concentrated extracts, the plant material residue of the hexane extract was finally used, placing dichloromethane-methanol (1: 1) and repeating the above process to obtain a concentrated extract. Total flavonoids were measured spectrophotometrically through the Aluminum Trichloride method, obtaining the following results: 16.69 ± 0.031 mg EQ / 10mg of dichloromethane-methanol extract, 12.74 ± 0.045 mg EQ / 10mg extract, of ethanolic extract and 12.10 ± 0.027 mg EQ / 10mg of the hexane extract of *Aristeguietia glutinosa*. The phenols were determined by the Folin-Ciocalteu method, resulting in the following values: 37.82 ± 0.007 mg EAG / 10mg of dichloromethane-methanol extract, extract 16.80 ± 0.002 mg EAG / 10mg of ethanol extract and 8.98 ± 0.009 mg EAG / 10mg of the hexane extract of *Aristeguietia glutinosa*. The anti-inflammatory activity test was carried out by the plantar edema and air pouch methods using carrageenan as an irritant. As a result, it is evident that in both methods, the AGDCMMM extract produces a reduction in inflammation, observing a greater effect in treated mice at a concentration of 30mg / kg. In conclusion, it can be indicated that at least one of the beneficial properties traditionally attributed to *Aristeguietia glutinosa* (matico) was scientifically proven, which may be due to the high concentration of flavonoids and phenols that it possesses.

Keywords: <BIOCHEMISTRY>, <PHARMACY>, <MATICO (*Aristeguietia glutinosa*)>, <DICHLOROMETHANE>, <PHYTOCHEMICAL EXTRACT>, < PHYTOMEDICAMENT >, <ANTIINFLAMATORY>, <PLANTAR EDEME>, < DICLOFENAC>.

INTRODUCCIÓN

En todo el mundo, las plantas medicinales son necesarias para el ser humano. Se conoce que existen suficientes evidencias científicas que justifican la utilización medicinal de las plantas como una alternativa terapéutica eficaz y eficiente (Cruz Suárez 2007, p. 10).

Los metabolitos son compuestos y sustancias químicas que actúan en curso del acrecentamiento de las plantas y se dividen en metabolitos: primarios y secundarios; los metabolitos primarios son necesarios en el curso del desarrollo y propagación de la planta formando parte de ellos los carbohidratos, proteínas y ácidos nucleicos, mientras los metabolitos secundarios siendo sustancias orgánicas tienen la capacidad de no interponerse en su crecimiento a la respuesta ante estímulos del entorno de las plantas las cuales no se puede apreciar totalmente en el procedimiento de respiración, asimilación y transporte. En los metabolitos secundarios se deben dictaminar dosis adecuadas para no causar un efecto adverso al ser vivo (García et al., 2016)

La Organización Mundial de la Salud reconoce la importancia de las terapias tradicionales y su alcance en el ámbito mundial, también ha creado una Oficina de medicinas tradicionales, a pesar de esto, el uso de las plantas medicinales sigue siendo muy poco reglamentado en términos generales en todos los países. Por esa razón es necesario que los consumidores dispongan de información contrastada que les permitan acceder a productos eficaces, seguros y de calidad. Precisamente, la Organización Mundial de la Salud ha publicado una serie de directrices destinadas a las autoridades sanitarias de los diferentes Estados, basadas en pruebas y experiencias realizadas en un centenar de países durante el año 2004, con el fin de establecer información fiable y adaptable a contextos específicos relativos al uso de las medicinas alternativas. Como reconoce esta organización, la atención primaria de salud de aproximadamente un 80% de la población de los países en desarrollo se basa en la terapia tradicional. En distinta proporción y con diferente filosofía, en los países desarrollados muchas personas recurren a diversos tipos de tratamientos naturales porque consideran que «natural» es sinónimo de inocuo (Hori y Sakajiri 2007, p. 15)

La *Aristeguietia glutinosa*, es nativa de la región Sierra del Ecuador que crece al borde de caminos, entre los matorrales cordilleranos y plantaciones en la región interandinas del país, entre 3000 a 3700 m sobre el nivel del mar, además se encuentra en los bosques montañosos húmedos tropicales o subtropicales de gran altitud, la cual está amenazada por la pérdida de hábitat.

La planta está compuesta en gran medida por un componente activo llamado tanino, al cual se le atribuyen propiedades cicatrizantes; también posee cumarinas, flavonoides, esteroides, alcaloides, saponinas y fenoles; que son compuestos que le otorgan sus bondades antiinflamatorias (Ayala y Vásquez 2013, p. 14).

Se ha comprobado la relación existente entre las enfermedades inflamatorias y el estrés oxidativo, es conocida la relación existente entre las especies reactivas del oxígeno y el nitrógeno que provocan estrés oxidativo como las enfermedades inflamatorias; por lo que extractos de plantas que presentan sustancias como flavonoides, polifenoles, tocoferoles entre otros metabolitos secundarios con capacidad antioxidante, en muchas ocasiones presentan efecto antiinflamatorio (García Bacallao et al. 2001, p. 214-215).

Los metabolitos secundarios de las plantas han proporcionado una fuente importante de medicamentos desde la antigüedad y ahora alrededor de la mitad de los medicamentos prácticos utilizados se derivan de fuentes naturales. de estos componentes herbales se recetan ampliamente para el tratamiento de afecciones antiinflamatorias (Mohammed et al., 2014).

OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

Objetivo General

- Evaluar la actividad antiinflamatoria de *Aristeguietia glutinosa* en ratones *Mus musculus*.

Objetivos Específicos

- Identificar los metabolitos secundarios presentes en las hojas de *Aristeguietia glutinosa* mediante tamizaje fitoquímico.
- Determinar la presencia de fenoles y flavonoides totales en los extractos de *Aristeguietia glutinosa*, mediante ensayos colorimétricos.
- Evaluar el efecto antiinflamatorio del extracto de *Aristeguietia glutinosa* a diferentes concentraciones en ratones *Mus musculus* con inflamación inducida, mediante la técnica de carragenina y airpouch.

CAPITULO I:

1. MARCO TEORICO REFERENCIAL

1.1.Inflamación

Para Bordés González y otros “la inflamación es un proceso tisular constituido por una serie de fenómenos moleculares, celulares y vasculares de finalidad defensiva frente a agresiones físicas, químicas o biológicas” (Bordés González et al., 1994, p. 1)

En el figura 1-1, se muestra los diferentes escenarios de la inflamación dependiendo de la causa que lo haya desencadenado, y aunque en un inicio representa un proceso universal e inespecífico al final puede conseguir resultados determinados por esas causas.

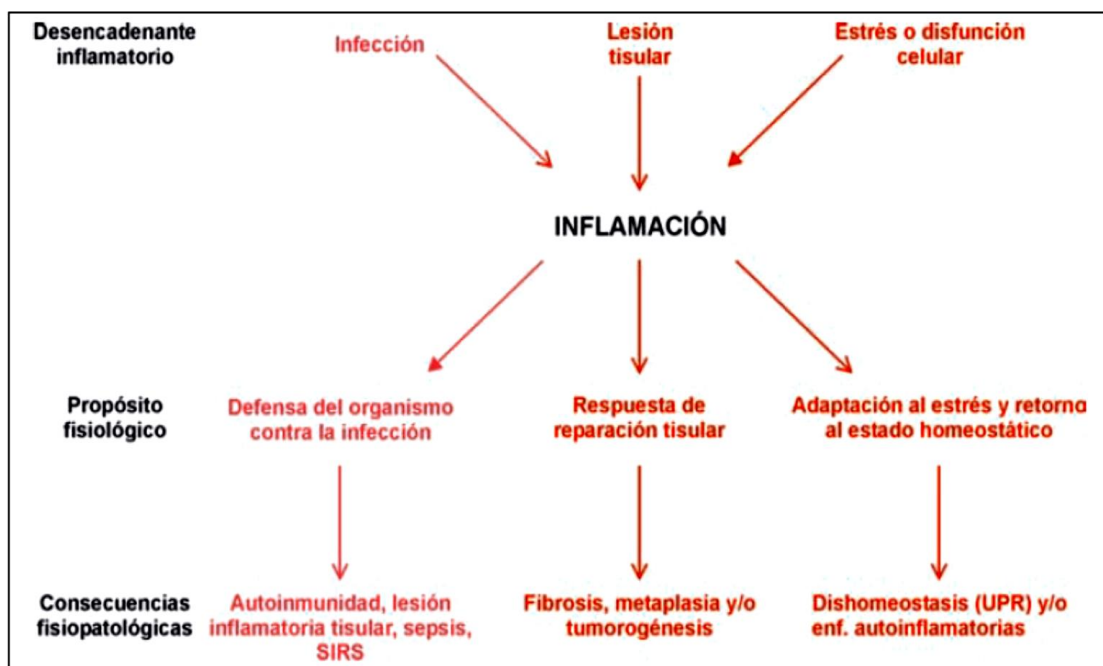


Figura 2-1: Proceso tisular de la inflamación

Fuente: (García Barreno, 2008, p. 91).

Para Vega Robledo existen agentes causales exógenos de la inflamación que son los siguientes: (Vega Robledo, 2008, p. 220)

- Biológicos: Bacterias, virus, hongos, parásitos.

- Químicos: Se deben considerar, además de los productos industriales y los consabidos ácidos y álcalis, sustancias que, por ser de uso común o cotidiano, pasan desapercibidas como generadoras de procesos inflamatorios, por lo que en este rubro se incluyen:
 - Artículos de uso personal: desodorantes, lociones, tintes, cosméticos, etcétera.
 - Artículos de uso doméstico: detergentes, pegamentos, halogenados o cáusticos en aerosol, desinfectantes, insecticidas, aromatizantes.
 - Productos alimenticios. Elementos utilizados en la conservación, el procesamiento y la industrialización de bebidas y alimentos (sustitutos artificiales, saborizantes, colorantes, ácidos, quelantes, conservadores).
 - Medicamentos. La automedicación, así como la polifarmacia y la falta de cuidado por parte del médico que, en ocasiones, se olvida de indicar al paciente medidas que contrarresten los efectos nocivos de algunos fármacos p.ej. administración de protectores de la mucosa gástrica.
 - Alcohol, tabaco y contaminantes ambientales.
- Físicos: Principalmente los relacionados con traumatismos, cirugías, quemaduras y radiaciones.

En lo que se refiere a los signos característicos de una inflamación se pueden mencionar los siguientes:

- El calor o aumento local de la temperatura secundario a vasodilatación, y aumento de consumo local de oxígeno.
- El rubor que es producido por el aumento de irrigación en la zona afectada, y por el incremento del flujo sanguíneo
- El dolor que es provocado por la distensión de los tejidos y liberación de prostaglandinas como mediadores químicos.
- El edema que es el resultado del aumento de la permeabilidad capilar y consiguiente sufusión de líquido en el tejido intersticial.

A estos signos “Rudolf Virchow, médico alemán, les sumó un quinto signo clínico, functiolaesa, que es la pérdida de funcionalidad, resultante de la limitación a la que conduce la conjugación de los cuatro signos ya mencionados” (Villalba Herrera, 2014, p. 2262).

1.1.1. Fases de la Inflamación

Las fases de la inflamación para Bordés González se distribuyen en cinco etapas que son:

- 1- Liberación de mediadores: Son moléculas que poseen estructura fundamental y una gran parte son sintetizadas o liberadas por el mastocito bajo la intervención de definidos estímulos.
- 2- Efecto de los mediadores: Estas moléculas al estar libres, ocasionan modificaciones vasculares y alteraciones quimiotácticas que benefician la aparición de células y moléculas invulnerables al foco inflamatorio.
- 3- Llegada de células y moléculas invulnerables al foco inflamatorio: Proceden en gran parte del flujo sanguíneo, pero también de las zonas circundantes al foco.
- 4- Regulación del proceso inflamatorio: Como la mayor parte de las respuestas inmunes, el fenómeno inflamatorio también componen sucesiones de mecanismos inhibidores propensos a finalizar o balancear en este proceso.
- 5- Reparación: fase constituida por fenómenos que van a especificar la restauración parcial o en la totalidad de los tejidos afectados por el agente atacante o por la respuesta inflamatoria (Bordés González et al., 1994, p. 9).

1.1.2. Clasificación de la Inflamación

La inflamación se clasifica por: (Paredes Atachao y Solano Manya, 2015, pp. 11-13)

- **Durabilidad:**

- Agudas: El agente agresor aparece de forma rápida, donde desata mediadores de protección del organismo por un tiempo corto en la zona de lesión iniciando inmediatamente.
- Crónicas: se produce daño tisular, inflamación diligente y un reiterado intento de reconstitución por medio de un proceso extenso.

- **Carácter del exudado:**

- Transudado: es la existencia de bajo volumen proteico en el líquido extravascular, siendo producto de una modificación leve en la permeabilidad vascular.
- Exudado: es la aparición del elevado volumen proteico en el líquido inflamatorio extravascular y denotando alta absorción en los vasos sanguíneos.

- **La etiología:**

- Infecciosas: causados por bacterias, virus, parásitos o por toxinas microbianas.
- Traumáticas: ocurre en los esguinces o higromas evidenciados a través de golpes intensos con evidencia inmediata o tardía.
- Térmicas: resultan a efecto de las quemaduras a causas de calor o congelamiento.
- Irradiaciones.
- Por exposición a agentes químicos ambientales:

- Necrosis tisular.
- Presencia de cuerpos extraños como astillas.
- Inmunitarias o reacciones de hipersensibilidad, a alérgenos comunes o procesos colagenopáticos.
- **Características morfológicas:**
 - Serosa: es de bajo volumen proteico causado por el almacenamiento de líquido tisular.
 - Fibrinosa: se evidencia elevado volumen de fibrinógeno, debido a la presencia de exudado.
 - Purulenta: consta de leucocitos y células necróticas reconocidos por la producción de exudados purulentos.
 - Abscesos: Presenta necrosis licuefactiva en el tejido inflamatorio supurante acompañado.
 - Úlceras: Producidas por esfacelamiento de tejido necrótico inflamado.
- **Localización:**
 - Focales: proviene del sufijo –itis, son producidas en órganos y zonas definidas. Se evidencia en procesos como: faringitis, otitis, laringitis, conjuntivitis, peritonitis.
 - Diseminados: resultado de la proliferación de las faseitos inflamatorios persistentes, evidenciando por vía canalicular, fistulización o metástasis (Culqui, 2017).

1.2. Biodiversidad del Ecuador

Para el Convenio sobre la Diversidad Biológica, la biodiversidad constituye toda la variedad de seres vivos que existen en la Tierra y los efectos naturales que durante millones de años han evolucionado las especies, tanto en la fauna como en la flora. La biodiversidad es consecuencia de varios procesos naturales como las actividades de las sociedades humanas, que abarca desde la variedad de ecosistemas hasta las diferencias genéticas dentro de una especie (Bravo Velásquez, 2014, p. 1).

Ecuador es uno de los países con mayor biodiversidad a nivel mundial, por lo que muchos lo han considerado como un país megadiverso. Nuestro país es rico en distintas formas de vida y de ecosistemas, pues de la biodiversidad depende la alimentación, la medicina, la provisión de bienes para la construcción, para la artesanía y para cubrir muchas necesidades de las poblaciones locales (Bravo Velásquez 2014).

Cuando se habla de biodiversidad también se refiere a las plantas y concretamente a las medicinales, que son las que nos ayudan principalmente en el campo de la medicina.

1.2.1. Plantas medicinales

Según el autor Fretes, las plantas según los efectos que éstas tienen sobre la salud humana se clasifican en: (Fretes, 2010, p. 7)

- Plantas medicinales: Son aquellos vegetales que elaboran unos metabolitos secundarios, llamados principios activos, sustancias que ejercen una acción farmacológica, beneficiosa o perjudicial, sobre el organismo vivo. Su utilidad primordial, a veces específica, es servir como droga o medicamento que alivie las enfermedades o restablezca la salud perdida. Constituyen aproximadamente la séptima parte de las especies existentes.
- Planta oficial: Es la que por sus propiedades farmacológicas está recogida en la farmacopea o que forma parte de un medicamento preparado conforme a las reglas de aquella.
- Plantas aromáticas: Son aquellas plantas medicinales cuyos principios activos están constituidos, total o parcialmente, por esencias. Representan alrededor de un 0,7% del total de las plantas medicinales.
- Plantas condimentarias o especias: Existe un cierto número de plantas aromáticas, por tanto, medicinales, que el hombre utiliza por sus características organolépticas, que comunican a los alimentos y bebidas ciertos aromas, colores y sabores, que los hacen más apetitosos, gratos y sabrosos al olfato, vista y paladar.

Concretamente se refiere a las plantas medicinales, que son las más utilizadas y por las cuales se realiza esta investigación. Por ello se remonta al largo de la historia para conocer su utilidad y beneficios.

La historia de la humanidad siempre ha estado ligada a las plantas medicinales, de hecho, antes de descubrir el fuego y domesticar a los animales, la subsistencia de las personas dependía mucho de las plantas, frutas y jugos que se extraían de las hierbas. Posteriormente, con el sedentarismo del hombre, aparece la agricultura y se cultivan plantas que servían de alimento; pero fueron los griegos quienes usaron las plantas en la medicina. El siglo XVII marcó el apogeo de las plantas medicinales y aromáticas, que hasta entonces se emplearon de manera limitada como medicina; su número había aumentado, pues aparecieron otras como la manigueta de Guinea y el anís estrellado de China. A finales del siglo XVIII, su valor principal era el curativo (Fretes 2010).

En la actualidad se estima que alrededor del 80% de la población mundial recurre a la medicina tradicional herbolaria para la atención primaria de la salud, pues es de conocimiento general que las plantas medicinales constituyen un mercado cada vez más promisorio para los países Iberoamericanos, en parte por el surgimiento en el ámbito mundial del consumo verde, que

reconoce la unidad del hombre con la naturaleza y busca fuentes terapéuticas en ésta; y, en gran medida por la necesidad creciente de recuperar nuestras raíces, nuestra cultura y nuestra identidad.

Es importante definir lo que es planta medicinal y para el autor Cruz Suárez significa “cualquier planta que en una o más de sus partes (hojas, flores, corteza, raíz, etc) contiene sustancias que la hacen útil para mejorar la salud de las personas o animales” (Cruz Suárez, 2007, p. 26).

1.2.1.1. Plantas con actividad antiinflamatoria

Las plantas medicinales que tienen actividad antiinflamatoria ayudan a prevenir o reducir las inflamaciones de los tejidos, puesto que poseen propiedades que ayudan a reducir el dolor y la zona afectada. Para ello, las plantas medicinales antiinflamatorias son la forma más natural que tenemos las personas a nuestra disposición para aliviar estas afecciones (Cruz Suárez 2007). La mayoría de las plantas medicinales se aplican en la zona afectada mediante una infusión con agua hirviendo o también se puede aplicar a manera de emplasto.

Una de las principales ventajas que tienen las plantas antiinflamatorias, es que poseen una diversidad de compuestos, por lo que se puede decir que su efecto es más de tipo fisiológico, debido a sus componentes activos que intervienen en reducir la inflamación y aumentan los genes antioxidantes para estimular las defensas naturales del organismo.

Para García Bacallao y otros, las plantas antiinflamatorias más comunes son: Harpagofito, Cúrcuma, Alfalfa, Jengibre, Verbena, Árnica, Ulmaria, Laurel, Arándano, Borraja, Castaño de indias, Milenrama, Aciano, Romero, Uña de Gato, Orégano, Tomillo, Albahaca, etc. También hay otras plantas que se utilizan para el mismo propósito como: Manzanilla, Limón, Rábano, Sábila, Hierbabuena, Romero, Ajo, Piña, Linaza, Ortiga, Lima, Cardamomo (García-Bacallao et al., 2001)

1.2.1.2. Metabolitos secundarios con propiedades antiinflamatorias

Las plantas medicinales poseen una gran cantidad de metabolitos secundarios como: fenoles, flavonoides y fitoesteroles.

- Fenoles. - En el reino vegetal hay una amplia gama de metabolitos secundarios que poseen núcleos fenólicos, sin embargo, en este epígrafe se hará referencia a los fenoles sencillos, los cuales suelen encontrarse en forma de glicósidos. Dentro de las estructuras más representativas están: pirogalol, eugenol y los ácidos cafeicos, cumárico, ferúlico,

clorogénico, siríngico, vainillínico, gentísico y protoocatequínico. (Fernández Urquiza y Torres Fuentes, 2013)

- Flavonoides. - Los flavonoides están presentes en casi cualquier vegetal superior y se les puede hallar en cualquier parte del vegetal. La mayoría de los flavonoides naturales presentan algunos de estos 12 núcleos: flavona, flavonol, flavanona, flavanonol, isoflavona, catequina, antocianidina, leucoantocianidina, aurona, chalcona, dehidrochalconas y neoflavonas. Los flavonoides se encuentran comúnmente en forma de glicósidos. Los principales sacáridos que se encuentran unidos a estos metabolitos secundarios son: arabinosa, galactosa, glucosa, ramnosa y xilosa. Los sacáridos pueden unirse a un carbono del flavonoide, y se les denomina C-glicósidos o pueden unirse a un hidroxilo del flavonoide y se les denomina O-glicósidos (Fernández Urquiza y Torres Fuentes, 2013).
- Fitoesteroles. - Los esteroides se encuentran en las células eucariotas, pero en las procariotas están ausentes. Tanto el reino animal como el vegetal producen esteroides, los cuales participan en la formación de las membranas. Bajo el nombre de fitoesteroides se agrupan los esteroides de origen vegetal los cuales pueden encontrarse en forma libre o esterificada. Aunque muy parecidos al colesterol en su estructura se diferencian de este en el grado de insaturación y en la configuración de la cadena lateral. Se han identificado más de 40 fitoesteroides, los más abundantes son β sitosterol, estigmasterol y campesterol (Fernández Urquiza y Torres Fuentes, 2013).

1.2.2. *Aristeguietia glutinosa* (Matico)

Esta planta silvestre crece en muchos lugares de la sierra ecuatoriana y solamente el 5% de la población aprovecha sus beneficios medicinales debido al desconocimiento, falta de costumbre y escepticismo (Bustamante Delgado et al., 2015).

1.2.2.1. Aspectos Taxonómicos

- Reino : Plantae
- División : Angiospermae
- Clase : Magnoliopsida
- Orden : Piperales
- Familia : Piperaceae
- Género : Piper
- Especie : P. aduncum
- N. común : Matico, Hierba del Soldado, Chuzalongo, Matigo, Micla, Melga

1.2.2.2. Descripción botánica

Para (Bustamante Delgado et al., 2015) la descripción botánica de la *Aristeguietia glutinosa* es la siguiente:

- Son unos arbustos perennes, normalmente de unos 2 a 4 metros de alto.
- Sus ramas son de color verde grisáceo, su corteza es lisa con nudos hinchados.
- Sus hojas son aromáticas con corto peciolo, ovaladas, redondeadas en la base, bordes dentados, alternadas en la rama, con un tamaño de aproximadamente 7-12 cm.
- Sus flores son pequeñas, reducidas, unisexuales con una inflorescencia en espiga apretada, forma curvada, tonalidad morada, fucsia y brácteas marrón oscuro.
- El fruto es una pequeña drupa, de color oscuro y contiene una semilla pequeña en su interior de color negro.
- Esta planta crece al borde los caminos, entre los matorrales y plantaciones de piretro en la región Interandina del Ecuador, entre 3000^a 3700 m.s.n.m.

1.2.2.3. Propiedades y usos

Actualmente, el uso que se le da a esta planta es múltiple y variado, a continuación, se enumera los beneficios que ofrece para la salud: (Bustamante Delgado et al., 2015)

- Alivia y cura las enfermedades del tracto respiratorio (antiinflamatorio y antitusígeno)
- Dolencias gastrointestinales (diarreas agudas o crónicas). Si se soasan 2 o 3 hojas a fuego lento y se las frota en todo el estómago, ayuda al empacho.
- La infusión de las hojas, sirven para hacer gárgaras y como vulnerario (para el lavado de las heridas externas)
- De igual manera la infusión de estas hojas mezclada con malva, se usa para los baños de asiento y lavados vaginales, siendo útil en los descensos de los fluidos y blanquecinos causados por el parásito *Trichomona vaginalis*, teniendo en cuenta que no se los debe realizar en los días de menstruación.
- Alivia las heridas provocadas por la sífilis.
- Posee propiedades astringentes, hemostáticas y vulnerarias.
- El matico posee cierta analogía de acción con la pimienta negra, la cubeta y el bálsamo de copaiba. Su acción sobre la mucosa gastrointestinal es tónica, estimulante; si se toma en exceso puede ser irritante y produce perturbaciones digestivas.

- Puesto en contacto con heridas o llagas recientes, disminuye y detiene los derrames sanguíneos y acelera la cicatrización.
- Ejerce sobre las mucosas una acción constructiva muy favorable para curación de flujos o hipersecreciones crónicas.
- Cura llagas y heridas de la nariz, encías.
- Se aconseja en úlceras sencillas del estómago y cáncer de este órgano
- Si se hace infusión, es útil para evacuar cálculos biliares.
- También se usa como emoliente y protector de la piel, a manera de jabón antiséptico.
- También es usado como aromatizante, las hojas son empleadas para envolver los alimentos que van a cocinar a la brasa, pues provee un agradable aroma y sabor.

1.2.2.4. Fitoquímica

El componente activo más importante del matico es el tanino, que se encuentra en una concentración del 5.7%, al cual se le atribuye las propiedades cicatrizantes. También contiene irioides, flavonoides, fenilpropanoides, triterpenos, aceite esencial, y otros (Buestan Orellana y Guaraca Merchan, 2013)

- Flavonoides: Cuyo representante típico es la escutelarena, encontrándose además linarina, luteolina y 6 – hidroxiluteolina (Montes,2001).
- Fenilpropanoides: Entre ellos verbascósido; que es un trisacárido, echinacósido es un disacárido (Montes,2001).
- Triterpenos: Como friedelinol, friedelina, epifriedelanona, damirenona, dammaradienilo (Alonso,2004).
- Aceite esencial: Como sesquiterpenos (g- gurjuneno, b-bisaboleno, trans-b-farneseno, b-sesquifelandreno), parafinas de 18 – 29 carbonos, ésteres metílicos de ácidos grasos (Alonso,2004).
- Otros: De guayanólidos, eupatorina, eupatilina, estigmasterol y diterpenos (ácido 15-HO-7-labdenoico) (Alonso,2004).

1.3. Animales de Laboratorio Ratones *Mus musculus*

Un animal de laboratorio es criado y reproducido en determinadas condiciones, mantenido en un entorno controlado, se lo utiliza para realizar pruebas de experimentación científica que ayuden afianzar pruebas de laboratorio para la busca de nuevas fuentes de investigación, recogida de datos reales que aporten dentro de un laboratorio o como docencia y que le sea útil al investigador (Fuentes Paredes et al. 2008, p. 7).

Entre los animales más comunes que se utilizan para este fin, son: el ratón, la rata, el conejo, el perro, el mono, el hámster, etc.

1.3.1. TAXONOMÍA

Clase : Mammalia

Familia : Muridae

Género : Mus

Especie: *Mus musculus* (Gabriela, 2012).

1.3.2. Ventajas de su uso como animal de laboratorio

El uso del ratón *Mus musculus*, ofrece las siguientes ventajas para los investigadores: (Fuentes Paredes et al. 2008, pp. 7-8) (Gabriela, 2012)

- Debido a su pequeño tamaño, son de fácil cuidado y mantenimiento
- Los costos de manutención del ratón *Mus musculus*, son bajos
- Tienen una cepa definida
- Poseen una diversidad de características específicas que sirven como modelo
- Tienen facilidad de reproductibilidad
- Son de vida corta y se puede aprovechar todo su material biológico para realizar varias pruebas de ensayos crónicos en diferentes áreas por ejemplo la farmacología.

1.3.3. Desventajas

Entre las desventajas del uso de estos animales, se pueden mencionar los siguientes: (Fuentes Paredes et al. 2008, pp. 7-8) (Gabriela, 2012)

- Dificultad en la obtención de material biológico.
- Dificultad en usar la cánula correcta para administrar los extractos vegetales.
- Dificultad de los procesos usados en el laboratorio.

1.4. Bases conceptuales

Antiinflamatoria o antiflogística es la propiedad química que prevé o combate la inflamación. Destacan dos clases principales de antiinflamatorios: Los glucocorticoides, antiinflamatorios con prednisolona y los antiinflamatorios sin esteroides (Lumitos 2019).

Los esteroides son esteroides con 27 a 29 átomos de carbono, formados por una cadena lateral de 8 ó más átomos de carbono (C) en el carbono 17 y un grupo alcohol o hidroxilo (OH) en el carbono 3. Se caracterizan por poseer el ciclo perhidrofenantreno, el cual es un núcleo policíclico complejo que puede presentar enlaces dobles (insaturados) y ramificaciones. Estas sustancias se encuentran en abundancia en los organismos vivos, sobre todo en animales y en algunas algas rojas. Son solubles en los disolventes orgánicos, y poseen un elevado punto de fusión (Lumitos 2019).

El exudado en medicina un exudado es el conjunto de elementos extravasados en el proceso inflamatorio, que se depositan en el intersticio de los tejidos o cavidades del organismo. Provoca el edema inflamatorio, diferenciándose del transudado por la mayor riqueza de proteínas y células (Lumitos 2019).

Los compuestos fenólicos clasificados como metabolitos secundarios de las plantas, son aquellos productos biosintetizados en las plantas que poseen la característica biológica de ser productos secundarios de su metabolismo, y la característica química de contener al menos un grupo fenol (un anillo aromático unido a al menos un grupo funcional hidroxilo) en su estructura molecular. En general son sintetizados por una de dos vías biosintéticas: la vía del ácido shikímico o la vía del ácido malónico (o por las dos, por ejemplo, los flavonoides) (Lumitos 2019).

Los fitoesteroides son compuestos naturales de origen vegetal presentes en alimentos como el aceite de girasol y la soya (Lumitos, 2019).

Flavonoide (del latín flavus, "amarillo") es el término genérico con que se identifica a una serie de metabolitos secundarios de las plantas. Son sintetizados a partir de una molécula de fenilalanina y 3 de malonil-CoA, a través de lo que se conoce como "vía biosintética de los flavonoides", cuyo producto, la estructura base, se cicla gracias a una enzima isomerasa. La estructura base, un esqueleto C6-C3-C6, puede sufrir posteriormente muchas modificaciones y adiciones de grupos funcionales, por lo que los flavonoides son una familia muy diversa de compuestos, aunque todos los productos finales se caracterizan por ser polifenólicos y solubles en agua. Los flavonoides que conservan su esqueleto pueden clasificarse, según las isomerizaciones y los grupos funcionales que les son adicionados, en 6 clases principales: las chalconas, las flavonas, los flavonoles, los flavandioles, las antocianinas, y los taninos condensados más una séptima clase, las auronas, tenidas en cuenta por algunos autores por estar presentes en una cantidad considerable de plantas. También el esqueleto puede sufrir modificaciones, convirtiéndose entonces en el esqueleto de los isoflavonoides o el de los neoflavonoides, que por lo tanto también son derivados de los flavonoides (Lumitos 2019).

La inflamación (del latín, inflammatio, encender, hacer fuego) es la forma de manifestarse de muchas enfermedades. Se trata de una respuesta inespecífica frente a las agresiones del medio, y está generada por los agentes inflamatorios. La respuesta inflamatoria ocurre sólo en tejidos conectivos vascularizados y surge con el fin defensivo de aislar y destruir al agente dañino, así como reparar el tejido u órgano dañado. La inflamación se denomina en medicina con el sufijo -itis (faringitis, laringitis, colitis...). El mayor problema que surge de la inflamación es que la defensa se dirija tanto hacia agentes dañinos como a no dañinos, de manera que provoque lesión en tejidos u órganos sanos (Lumitos 2019).

Los metabolitos secundarios de las plantas se llaman metabolitos secundarios de las plantas a los compuestos químicos sintetizados por las plantas que cumplen funciones no esenciales en ellas, de forma que su ausencia no es fatal para la planta, ya que no intervienen en el metabolismo primario de las plantas. Los metabolitos secundarios de las plantas intervienen en las interacciones ecológicas entre la planta y su ambiente (Lumitos 2019).

La necrosis (del griego: Νεκρός. Pronunciación aproximada: nekrós. Significado: muerte) es la muerte patológica de un conjunto de células o de cualquier tejido del organismo, provocada por un agente nocivo que ha provocado una lesión tan grave que no se puede reparar o curar como por ejemplo el aporte insuficiente de sangre al tejido o isquemia, un traumatismo, la exposición a la radiación ionizante, por la acción de sustancias químicas o tóxicos, por una infección, o por el desarrollo de una enfermedad autoinmune o de otro tipo. Una vez que se ha producido y desarrollado la necrosis, es irreversible. Es una de las dos expresiones morfológicas reconocidas de muerte celular dentro de un tejido vivo (Lumitos 2019).

Los triterpenos consisten de 6 unidades y tienen la fórmula molecular $C_{30}H_{48}$. El triterpeno lineal escualeno es el mayor constituyente del Aceite de Hígado de Tiburón, es derivado de la unión reductiva de dos moléculas de farnesilpírofosfato. El Escualeno es procesado Biosintéticamente para generar lanosterol, el precursor estructural para todos los esteroides (Lumitos 2019)

CAPÍTULO II

2. MARCO METODOLOGICO

2.1. Población de estudio

La población corresponde a 66 ratones *Mus musculus* machos, en los cuales se evaluó la actividad antiinflamatoria por medio de los métodos de carragenina y airpouch,

2.2. Tamaño de la Muestra

El tamaño de muestra corresponde al total de la población. Se evaluó en sesenta y seis animales de experimentación, separados en dos grupos con inflamación inducida; el primer grupo por el método de edema plantar con carragenina con tres bloques experimentales y dos bloques de control, cada uno formado por seis unidades de experimentación; y el segundo grupo por el método de air pouch con tres bloques experimentales y tres bloques de control, cada uno formado por seis unidades de experimentación.

2.3. Lugar de la investigación

La presente investigación se la realizó en la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, en la Facultad de Ciencias, Escuela de Bioquímica y Farmacia, en los laboratorios de Productos Naturales, Análisis Instrumental, Química Orgánica y Bioterio; con la colaboración de la Universidad Autónoma de los Andes, a través de su laboratorio de Biología Molecular.

2.4. Equipos, Materiales y Reactivos

2.4.1. Equipos

Los equipos usados en la presente investigación, fueron:

Tabla 1-2: Equipos

EQUIPOS	PROCEDIMIENTOS DE USO
Espectrofotómetro	Cuantificación de proteínas totales, fenoles y flavonoides

Desecador, mufla y estufa	Obtención de cenizas, análisis de humedad
Desecador, mufla y estufa	Obtención de cenizas, análisis de humedad
Balanza analítica	Determinación de pesos
El rota vapor	Concentrar los extracto
Microscopio	Observación de glóbulos blancos
Contador Hematológico Myndrive 5300	Contaje de glóbulos blancos, rojos y plaquetas
Agitador eléctrico	Homogeneizar muestras biológicas
Vortex	Homogeneizar muestras biológicas
Sonicador	Agitar las partículas de una muestra por medio del sonido
Calibrador (Pie de Rey) automático Rey	Medir dimensiones internas y profundidades de objetos relativamente pequeños
Reverbero	Calentar las muestras
Centrífuga	Separar las muestras biológicas en fases
Bombona de oxígeno	Aplicar oxígeno puro O ₂ a los ratones
Triturador	Pulverizar la planta
Agitador orbital	Agitar y calentar las muestras en tubos
Espectrómetro UV visible	Medir la absorbancia
Autoclave	Esterilizar materiales

Elaborado por: José Andrade y Marco Murillo

2.4.2. *Materiales*

Los materiales que se usaron en la presente investigación, son:

Tabla 2-2: Materiales

MATERIALES	CANTIDAD	PROCEDIMIENTOS DE USO
Fundas herméticas	4	Recolección, preparación, triturado de almacenado de la planta
Papel aluminio	1	
Papel de despacho	1	
Papel filtro	1	
Frascos ámbar extracto	3	Obtención y concentración de los extractos
Balones esmerilados	3	
Vasos de precipitación 1000ml	3	
Tubos de ensayo de 10ml	70	Tamizaje Fitoquímico

Pipetas pasteur	70	
Cápsulas	2	
Crises	2	
Desecador	1	
Cajas de plástico grandes	6	Adquisición y ambientación de los ratones <i>Mus musculus</i>
Cajas de plástico pequeñas	12	
Rejillas grandes	6	
Rejillas pequeñas	12	
Tamo esterilizado	1 qq	
Botellas de vidrio de 250ml	12	
Chupones	12	
Fundas rojas	20	
Escoba	1	
Trapeador	1	
Toallas de tela	2	
Toallas de manejo	2	
Marcadores permanentes	6	
Balanceado de ratón	1 qq	
Balones de aforo de 100ml	3	Preparación del vehículo
Pipetas automáticas	2	
Puntas azules	66	
Puntas amarillas	66	
Pistilo	1	
Mortero	1	
Piseta	1	
Espátulas	1	
Tubos eppendorf	66	Preparación y administración del extracto
Tubos falcon	66	
Jeringuillas de 1ml	66	
Cánula para ratones	1	
Algodón	1	
Vasos de 250ml	1	Generación de la inflamación
Probeta	1	
Imanes	2	
Jeringuilla de 5ml	108	

Jeringuilla de 3ml	66	
Filtros de O2 puro de 0.22um	108	
Bombona de oxígeno	1	
Cámara de oxígeno	1	
Rasuradoras manuales	36	
Rasuradora automática	1	
Pipetas Pasteur	36	Toma de muestras y eutanasia de los ratones
Jeringuilla de 3ml	66	
Kit de disección	1	
Tubos con EDTA	30	
Tubos Falcon	72	
Cooler	1	
Tubos de ensayo de 5ml	36	Análisis de resultados
Puntas azules	36	
Puntas amarillas	36	
Cámara de Neubauer	2	
Cubre objeto	2	
Gradillas plásticas	3	
Guantes de manejo	2 cajas	Materiales de bioseguridad
Mascarillas	1 caja	
Mandiles	2	
Zapatones	3 cajas	
Cofias	1 caja	

Elaborado por: José Andrade y Marco Murillo

2.4.3. *Reactivos*

Los reactivos usados en la presente investigación son:

Tabla 3-2: Reactivos

REACTIVOS	PROCEDIMIENTOS DE USO
Hexano	Obtención y concentración de los extractos
Diclorometano	
Metanol 97%	
Etanol 97%	

Colorante Sudán III	Análisis Fitoquímico
Ácido clorhídrico 1%	
Ácido clorhídrico concentrado	
Reactivo de Dragendorff	
Cloruro de sodio en polvo	
Solución de Mayer	
Reactivo de Wagner	
Reactivo de Baljet	
Hidroxamato férrico	
Hidróxido de potasio 10 % en etanol	
Ácido clorhídrico 0.5 mol/L	
Cloruro férrico 1%	
Hidróxido de sodio 10% en agua	
Ácido pícrico 1% en etanol	
Reactivo de Borntrager	
Cloroformo	
Amonio 5% en agua	
Reactivo de Lieberman-Burchard	
Anhídrido acético	
Carbonato de Sodio	
Fehling A	
Fehling B	
Tricloruro férrico 5% en solución salina	
Ninhidrina 2%	
Alcohol amílico	
Reactivo de Kedde	
Ácido 3.5 dinitrobenzoico 2% en metanol	
Hidróxido de potasio 5.7% en agua	
Tween 80	Preparación del vehículo
Cloruro de sodio 0.9%	
Diclofenaco sódico de 100mg	
Ketamina	Anestesia de biomodelos
Carragenina	Generación de la inflamación
Agua destilada	
EDTA	Toma de muestras y eutanasia de los ratones

Éter	Análisis de resultados
Tinción de Wrigth	
Bradford Reagent	
Nitrito de Sodio 5%.	
Cloruro de Aluminio 10%.	
NaOH 1M	
Folin Ciocalteu	
Carbonato de Sodio al 7.5%,	
Agua destilada	
Ácido gálico	
Quercetina	

Elaborado por: José Andrade y Marco Murillo

2.5. Selección de la planta

La selección de *Aristeguietia glutinosa* se lo realizo en base a las cualidades curativas en especiales las antiinflamatorias; que son las que se necesitan para la presente investigación. Además, se encontró que desde la antigüedad se le ha dado múltiples usos medicinales a esta planta.

2.5.1. Identificación de la planta

Se indentifico

2.6. Recolección de la planta

La materia vegetal de *Aristeguietia glutinosa* se recolectó en la Comunidad Tepeyac Alto vía a Pallatanga-Balvanera, Cantón Colta, Provincia de Chimborazo; a una altura promedio de 3650 m.s.n.m. La investigación se realizó identificando la plata en el Botánico de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo realizado por el Ing. Jorge Caranqui Msc.bajo el contrato de acceso a recursos genéticos suscrito entre la ESPOCH y el Ministerio del Ambiente del Ecuador Nro.015-IC-DPACH-MAE-2019-RENOVACION (Anexo A).

Latitud: 01° 47' S

Longitud: 78° 51' W

2.7. Preparación de la muestra

De la planta *Aristeguietia glutinosa* fueron seleccionadas las hojas integrales, se lavaron y secaron en la estufa a 40°C por 96 horas, se trituraron en un molino pulverizador y fueron almacenadas en un lugar seco y sin incidencia de la luz (Anexo B).

Con el pulverizado se realizó el control de calidad del material vegetal realizado pruebas por triplicado para obtener valores reales usando procesos físico-químicos para tener una droga cruda de calidad (Miranda y Cuellar, 2000, p. 31).

2.7.1. Control de calidad de la droga cruda

2.7.1.1. Parámetros físicos

- **Determinación de la humedad**

La determinación del contenido de humedad se realizó utilizando un método gravimétrico que consiste en la pérdida de masa a través del secado en una estufa. Para este ensayo se empleó 5 gramos de planta seca y triturada, la misma que se situó en una capsula de porcelana previamente tarada, que luego se introdujo en una estufa por 3 horas a una temperatura de 105 °C. Cumplido el tiempo se retiró la cápsula y se situó en un desecador hasta llegar a temperatura ambiente. Nuevamente se trasladó la cápsula a la estufa por alrededor de una hora y nuevamente se colocó en el desecador. Repitiéndose el proceso hasta alcanzar una masa constante, el porcentaje de humedad se calculó a través de la siguiente fórmula (Miranda y Cuellar, 2000, p. 34-35). (Anexo C)

$$\%H = \frac{M_2 - M_1}{M_2 - M} * 100$$

Donde:

%H= Porcentaje de pérdida de peso por desecación (%)

M1= masa de la cápsula con la muestra desecada (g)

M2= masa de la cápsula con la muestra (g)

M= masa de la cápsula vacía (g)

100= factor matemático

- **Determinación de cenizas totales**

Las cenizas totales pertenecen a los minerales, después de incinerar el pulverizado de *Aristeguietia glutinosa*.

Se pesaron $5g \pm 0.5$ mg de pulverizado de *Aristeguietia glutinosa* en un crisol de porcelana. Luego, se carbonizó la muestra en un reverbero y se incineró en la mufla por un lapso de dos horas en una temperatura de 700°C . Se colocará el crisol en el desecador por 2 horas y se pesa, el proceso se repite hasta que en dos pesadas consecutivas la masa sea constante (Miranda y Cuellar, 2000, p. 32). Finalmente, el residuo final debe presentar un color blanco. (Anexo D)

Para obtener el resultado se aplicará la siguiente fórmula:

$$\%C = \frac{M_2 - M}{M_1 - M} * 100$$

Dónde:

$\%C$ = porcentaje de cenizas totales.

M = masa del crisol vacío (g)

M_1 = masa del crisol con la porción de ensayo (g)

M_2 = masa del crisol con la ceniza (g)

100 = factor matemático para los cálculos.

- **Determinación de cenizas solubles en agua**

Las cenizas solubles en agua corresponden a la parte de las cenizas totales con capacidad de disolverse en agua.

Para la determinación se procedió a colocar en el crisol con cenizas totales obtenidas anteriormente, 15 mL de agua, se tapa y se hirvió ligeramente en un mechero por 5 minutos. Empleando papel filtro libre de cenizas, se filtró y se transfiere al crisol inicial, se carbonizó en el mechero y se procedió a incinerar en la mufla a 700°C , por un lapso de 2 horas. Finalmente, se trasladó a un desecador hasta alcance la temperatura ambiente y pesar (Miranda y Cuellar, 2000, p. 33). Se repitió el proceso hasta conseguir un peso constante.

Para obtener el resultado se aplicará la siguiente fórmula:

$$Ca = \frac{M_2 - Ma}{M_1 - M} * 100$$

Dónde:

Ca = porcentaje de cenizas solubles en agua en base hidratada.

M₂ = masa del crisol con las cenizas totales (g).

Ma = masa del crisol con las cenizas insolubles en agua (g)

M₁ = masa del crisol con la muestra de ensayo (g)

M = masa del crisol vacío.

100 = factor matemático.

- **Determinación de cenizas insolubles en ácido clorhídrico**

Las cenizas ácido insolubles son las que se obtiene posterior a la disolución de las cenizas totales en ácido clorhídrico al 10%. Este parámetro permite medir la cantidad de sílice contenida en la planta, principalmente tierra silíceo y arena.

Para lo cual a las cenizas totales se agregó 2 mL de ácido clorhídrico al 10%, se tapó con un vidrio reloj y se calienta en un baño de agua por 10 minutos. Luego, se lavó el vidrio reloj con 5mL de agua caliente uniéndolo al contenido del crisol. Se filtró la solución; se lavó el residuo con agua caliente, se añaden dos gotas de nitrato de plata (AgNO₃) 0.1 Molar hasta que la solución obtenida de la filtración no indique presencia de cloruros. Posteriormente, el filtrado se deseca a 100°C, se transfiere al crisol inicial y se incinera en la mufla durante 2 horas a una temperatura de 700°C (Miranda y Cuellar, 2000, p. 33). Finalmente, se ubicó en el desecador hasta que alcance la temperatura ambiente y se pesa hasta conseguir masa constante.

Se aplicará la siguiente fórmula para obtener el resultado:

$$B = \frac{M_2 - M}{M_1 - M} * 100$$

Dónde:

B= porcentaje de cenizas insolubles en ácido clorhídrico en base hidratada.

M = masa del crisol con la porción de ensayos (g)

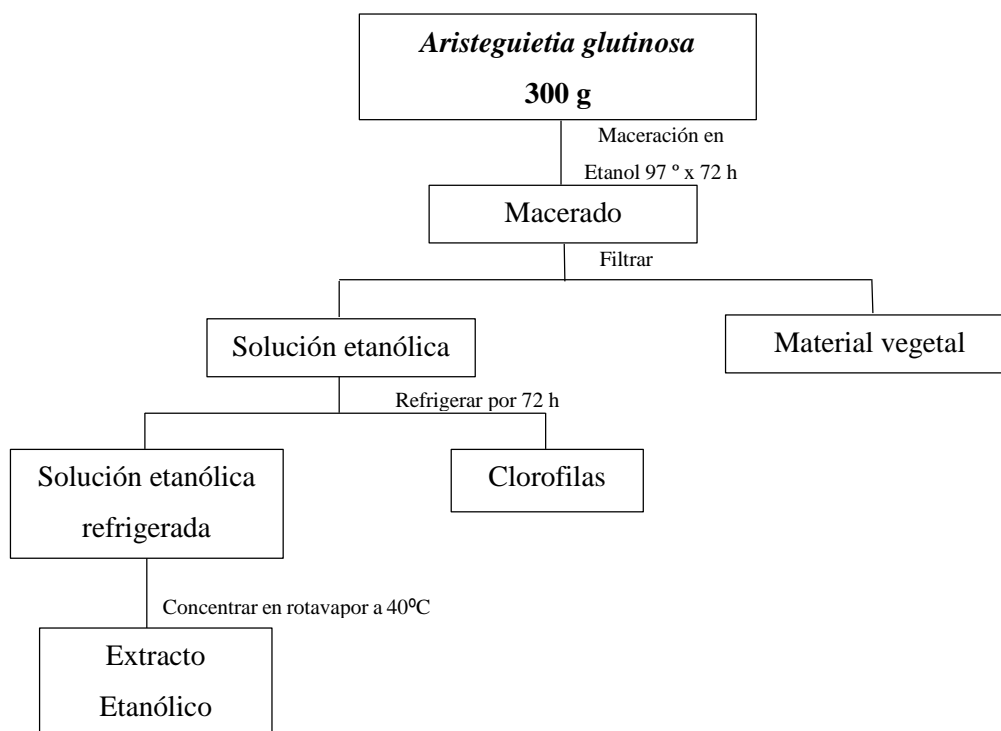
M₂= masa del crisol con la ceniza (g)

100= factor matemático.

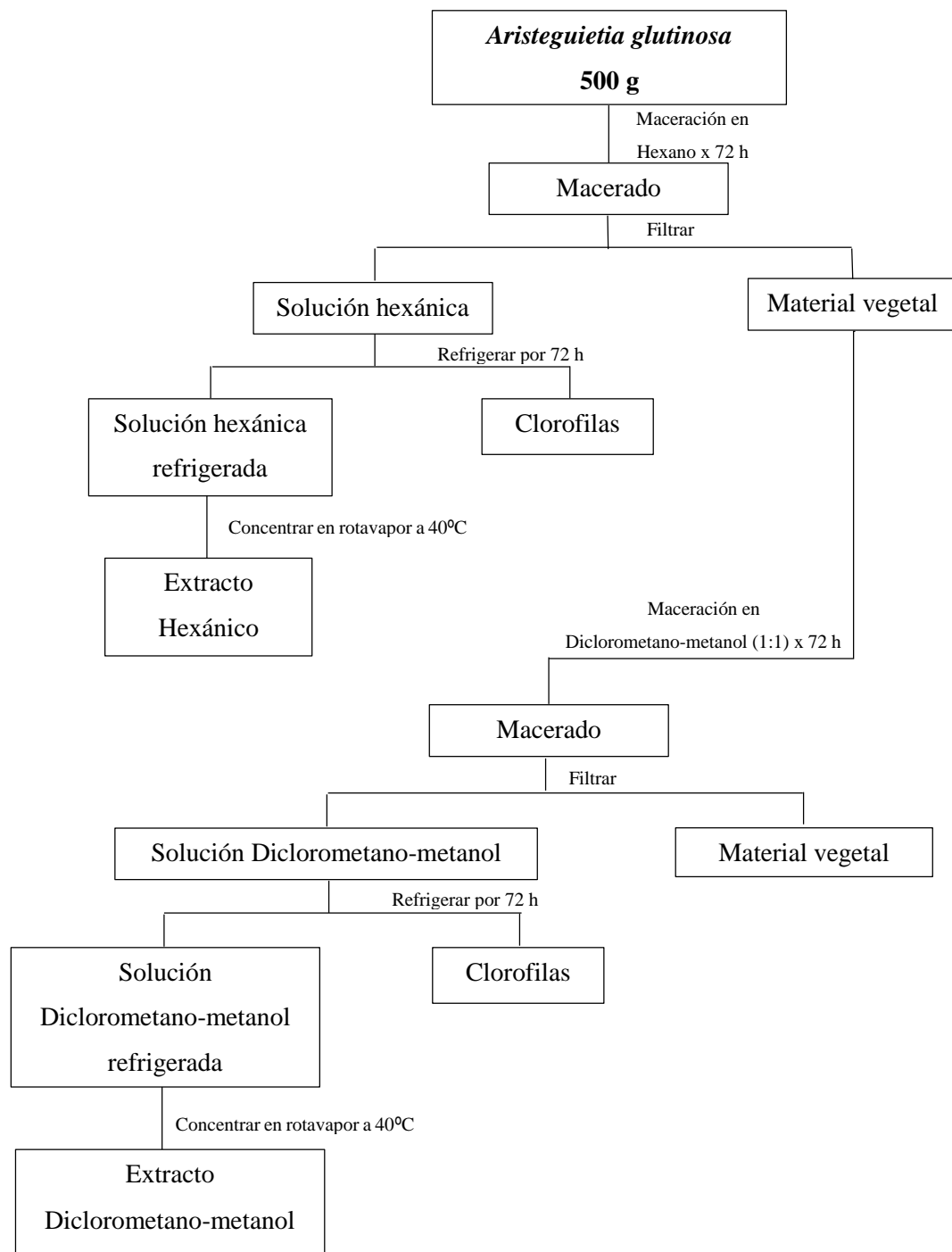
2.8. Obtención de extractos

La obtención de los extractos etanólico, hexánico y diclorometano-metanol (1:1) se lo realizo mediante el siguiente esquema: (Anexo E)

- **Extracto etanólico**



- **Extracto hexánico y diclorometano-metanol (1:1)**



2.9. Tamizaje fitoquímico

Es una serie de ensayos cualitativos que se realizan para determinar los grupos fitoquímicos presentes en un *extracto* (Anexo F) (Miranda y Cuellar, 2000, p. 38).

- **Ensayo de Sudan**

Con este ensayo se identifica compuestos grasos. Para lo cual a 5 mL del *extracto* se le añade 1 mL del reactivo Sudan III o Sudan IV. Se calienta la mezcla hasta total evaporización del solvente. La presencia de compuestos grasos se considera positiva si aparecen gotas o una película coloreada de rojo en el seno líquido o en las paredes del tubo de ensayos respectivamente (Miranda y Cuellar, 2000, p. 39).

- **Ensayo de Dragendorff**

Este ensayo permite determinar la presencia de alcaloides en la muestra. Para lo cual se toma una alícuota del *extracto* y se coloca a baño maría, al residuo se le añadirá ácido clorhídrico al 1%. A esta mezcla ácida se añadirá 3 gotas del reactivo Dragendorff y se reportarán los resultados, si hay opalescencia se considera (+), turbidez definida (++), precipitado (+++) (Miranda y Cuellar, 2000, p. 40).

- **Ensayo de Mayer**

Se procede de la misma manera que el ensayo de Dragendorff hasta obtener la solución ácida, donde se añade una pizca de cloruro de sodio en polvo luego se agita y filtra. Finalmente se añade 2 a 3 gotas del reactivo de Mayer, si hay opalescencia se considera (+), turbidez definida (++), precipitado coposo (+++) (Miranda y Cuellar, 2000, p. 40).

- **Ensayo de Wagner**

Se procede de la misma manera que en el ensayo de Dragendorff de la solución ácida, donde se añade 3 gotas del reactivo Wagner y los resultados se reportan de manera similar (Miranda y Cuellar, 2000, p. 41).

- **Ensayo de Lieberman-Burchard**

Con este ensayo se evalúa la presencia de triterpenos y/o esteroides. Se evapora el solvente en baño maría y se añade 1 mL de anhídrido acético. Se adiciona de 2 a 3 gotas de ácido sulfúrico concentrado sin agitar. Un cambio positivo se tiene por un cambio rápido de coloraciones rosado-azul muy rápido, vere intenso-visible aunque rápido y verde oscuro-negro-final de la reacción (Miranda y Cuellar, 2000, p. 42).

- **Ensayo de Borntrager**

Nos permite determinar la presencia de quinonas. Del *extracto* se evapora el solvente en baño maría. Se añade 1 ml de NaOH o KOH. Luego se agita hasta mezclar completamente y se deja en reposo para que las fases se separen. Se considera que es positivo cuando la coloración rosad (+++) y coloración roja (+++) (Miranda y Cuellar, 2000, p. 41).

- **Ensayo de catequinas**

Se toma una gota del *extracto* con un capilar y se aplica en papel filtro. Sobre la gota del papel filtro se aplica una solución de carbonato de sodio. La aparición de un precipitado, indica un ensayo positivo (Miranda y Cuellar, 2000, p. 42).

- **Ensayo de Fehling**

Se identifican azúcares reductores con este ensayo. A la muestra se añade de 1-2 mL de agua, posteriormente 2 mL del reactivo y se calienta en baño maría de 5 a 10 min, se coloca 3 gotas de solución A y 3 gotas de solución B. Se considera positivo cuando la coloración se torna de color rojo (Miranda y Cuellar, 2000, p. 42).

- **Ensayo de Hidroxamato férrico para cumarinas**

En un tubo sea agrega una gota de clorhidrato de hidroxilamina disuelto en etanol 10%, luego se añade unas gotas de hidróxido de potasio 10% en etanol y se calienta hasta ebullición, se coloca unas gotas de ácido clorhídrico 0.5 molar (M) y una gota de cloruro férrico al 1% en agua. Es

positivo cuando se produce una coloración violeta (+), claro(++) e intenso (+++)(Miranda y Cuellar, 2000, p. 41).

- **Ensayo de cloruro férrico**

Se identifican taninos y compuestos fenólicos. A una porción del *extracto* alcohólico se añadirá 3 gotas de solución de tricloruro férrico al 5%, en este *extracto* el ensayo determinará taninos como fenoles. En el *extracto* acuoso se determinará el ensayo taninos. En una alícuota del *extracto* se añadirá acetato de sodio para neutralizar y 3 gotas de cloruro férrico al 5%: Se reporta positivo cuando hay una coloración rojo-vino para compuestos fenólicos en general, una coloración verde intensa para taninos del tipo pirocatecólicos y coloración azul para taninos del tipo pirogalotánicos(Miranda y Cuellar, 2000, p. 43).

2.10. Cuantificación de Fenoles y Flavonoides Totales

2.10.1. Cuantificación de Flavonoides

La determinación de flavonoides totales se fundamenta en una reacción colorimétrica entre el $AlCl_3$ y los flavonoides presentes que forman un complejo de color rosado, posteriormente se mide la absorbancia a través de un espectrofotómetro (Soares et al. 2003).

Se procede a partir de la preparación de una solución a 100 ppm de diclorometano-metanol (1:1), luego se añadió 0.3 mL de $NaNO_2$ al 5%, se homogenizó en un agitador vortex y se dejó reposar por 5 minutos. Luego se agregó 0.3 mL de $AlCl_3$, se vortexizó por 1 minuto y nuevamente se dejó reposar en un lugar oscuro por 5 minutos. Después de este periodo de tiempo se agregó 2 mL de $NaOH$ a una concentración 1N, se homogenizó en un agitador vortex por 15 segundos y se dejó reposar en un lugar oscuro durante 15 minutos, posteriormente se midió la absorbancia en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 510 nm (Vinueza et al., 2017, p. 161).

El cálculo de flavonoides totales se realizó mediante la ecuación de la recta $y = 0.0002x + 0.0056$, del estándar de quercetina, con un coeficiente de correlación de $R^2 = 0.999$ (Anexo G)(Hidalgo, 2019).

2.10.2. Cuantificación de Fenoles

La cuantificación de fenoles totales de *Aristeguietia glutinosa* se la realizó por un método espectrofotométrico, este se basa en una reacción colorimétrica de óxido reducción, donde la sustancia oxidante fue el reactivo de Folin-Ciocalteu.

Se prepara la solución con el extracto diclorometano-metanol a 100 ppm, se agregó 15 mL de agua desionizada y 1.25 mL de reactivo Folin Ciocalteu, con la ayuda de un agitador Vortex se homogenizó las muestras durante 30 segundos y se dejó en reposo por un periodo de 8 minutos. Luego se adicionó 3.75 mL de carbonato de sodio al 7.5%, luego en un balón de aforo de 25 mL con agua destilada. Se agita en vortex durante 1 min y se deja reposar durante 2 horas en oscuridad completa. En el espectrofotómetro se mide a una longitud de onda de 765 nm (Vinueza et al., 2017, p. 161).

El cálculo de fenoles totales se realizó mediante la ecuación de la recta $y = 0.0008x + 0.0133$, del estándar de ácido gálico, con un coeficiente de correlación de $R^2 = 0.9992$ (Hidalgo, 2019).

2.11. Biomodelos de laboratorio

2.11.1. Biomodelos en el bioterio

La adquisición de ratones *Mus musculus* se lo realizó en el Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública-INSPI Dr. Leopoldo Izquieta Pérez sede Guayaquil, se solicitó mediante formularios 70 ratones *Mus musculus* albinos machos de 25g de 70 días, para lo cual en el pedido se realiza un acuerdo de ambas partes a respetar los compromisos de NO REPRODUCCIÓN de las especies entregadas por el INSPI, asegurando la aplicación de todos los principios éticos relacionados con el manejo y uso adecuado de animales de laboratorio. Los biomodelos se adquirieron el 17 de julio del 2019 a la 14h00 en la ciudad de Guayaquil y se trasladaron al bioterio de la Facultad de Ciencias de la ESPOCH, donde fueron recibidos por el BQF. Benjamín Román tecnico docente (Fuentes Paredes et al. 2008, p. 13)

2.11.2. Ambientación de los biomodelos en el bioterio

Para la ambientación se distribuyó a los sesenta y seis ratones en 11 cajas, cada una de ellas conformadas por 6 unidades, colocando una marca en la cola con marcadores de diferentes colores para tener un registro diario de cada biomodelo animal durante un periodo de 15 días hasta conseguir un peso constante de $27g \pm 2$, así se los distribuyó en 2 grupos; el primer grupo por el método de edema plantar con carragenina se estableció 3 bloques experimentales correspondientes a 30, 100 y 300mg/Kg de peso y dos bloques control positivo y negativo; y para el método de air pouch con tres bloques experimentales 30, 100 y 300mg/Kg de peso y dos bloques control positivo, negativo y blanco (Anexo H) (Fuentes Paredes et al. 2008, p. 14) .

2.12. Preparación del vehículo

El vehículo utilizado fue el tween 80 al 5% en cloruro de sodio, para diluir el extracto diclorometano-metanol de *Aristeguietia glutinosa*, el cual se preparó diluyendo 5 ml de tween 80 y se aforo a 100 ml con cloruro de sodio al 0,9% (Sarker et al. 2012, p. 135).

2.13. Preparación de la carragenina

Se preparó carragenina al 1% en cloruro de sodio, la cual sirvió para inducir inflamación en los modelos de edema plantar y air pouch (Cordeiro et al., 2016).

2.14. Preparación del control positivo

Se pesó 100 mg de diclofenaco sódico y aforó en un balón de 100ml con el vehículo (Gupta et al., 2015).

2.15. Preparación a distintas concentraciones del extracto

Se pesó el extracto diclorometano metanol (1:1) (DCMMM) de *Aristeguietia glutinosa* y se diluyó en el vehículo para obtener tres distintas concentraciones de 30, 100 y 300 mg/Kg de peso corporal, se homogenizó la muestra con el vortex por 10 segundos y luego en el agitador orbital a 40 °C (Anexo I) (Pal et al., 2012).

2.16. Administración de dosis a los ratones *Mus musculus*

Se marcó los animales en la cola con un marcador indeleble para identificar al grupo blanco (vehículo), control negativo, control positivo y dosis a usar como tratamiento, luego los animales tuvieron un ayuno de 12 horas para mejorar la absorción del tratamiento y al haber transcurrido 12 horas se procedió administrar por vía oral con el uso de una cánula de ratones:

- **Modelo edema plantar**
 - ✓ Vehículo
 - ✓ Control positivo
 - ✓ Concentraciones 30 mg/kg
 - ✓ Concentraciones 100 mg/kg
 - ✓ Concentraciones 300 mg/kg

Estos tratamientos se lo realizaron 1 hora antes de la inducción de la inflamación.

- **Modelo air pouch**

- ✓ Vehículo sin estímulo inflamatorio
- ✓ Control negativo
- ✓ Control positivo
- ✓ Concentraciones 30 mg/kg
- ✓ Concentraciones 100 mg/kg
- ✓ Concentraciones 300 mg/kg

Estos tratamientos se lo realizaron 1 hora antes de la inducción de la inflamación.

2.17. Modelos para generar inflamación

2.17.1. Modelo de edema plantar inducido por carragenina

Al biomodelo animal se le inmovilizó y administró vía oral con una cánula el control negativo (vehículo), el control positivo y el extracto *AGDCMM* a sus distintas concentraciones, después de una hora se inyectó 40µl de carragenina en la pata trasera derecha; usando el pie de rey digital se midió la pata indicada al tiempo 0 H y durante cada hora hasta obtener una medida constante (Anexo J).

El porcentaje de inhibición de la inflamación de cada bloque será obtenido según la siguiente fórmula:

$$\%Inhibición = \frac{(Ct - C0)control - (Ct - C0)tratado}{(Ct - C0)Control} * 100$$

Dónde $(Ct - C0)control$ es la diferencia de medidas de la pata en 6 horas en el control del ratón y $(Ct - C0)tratado$ es la diferencia de las medidas de la pata en 6 horas en cualquier ratón tratado con el estándar del *AGDCMMMM* (Aouey et al., 2016).

2.17.1.2. Biometría hemática

Una vez obtenida una medida constante de la pata trasera derecha para aprovechar el material biológico se extrajo sangre directamente del corazón y realizó una biometría hemática de cada una de las muestras (Anexo K).

2.17.2. Modelo de inflamación por air pouch

La bolsa de aire subcutánea es un modelo in vivo para estudiar los componentes de la inflamación aguda y crónica, la resolución de la respuesta inflamatoria, la respuesta al estrés oxidativo y las posibles dianas terapéuticas para tratar la inflamación. La inyección de agentes irritantes en una bolsa de aire en ratones indujo una respuesta inflamatoria que se cuantificó por el volumen de exudado producido, la infiltración de células y la liberación de mediadores inflamatorios.

Previa a la producción de la bolsa de aire se procede a la anestesia de los biomodelos con Ketamina mediante una inyección subcutánea en la zona pélvica.

Para producir la bolsa de aire se inyectó subcutáneamente 3 ml de aire estéril en el área subescapular de la parte posterior del ratón *Mus musculus* 3 veces cada 48 horas, 24 horas después de la última aplicación se administran los tratamientos vía oral, una hora después se inyecta en la zona 0,4 µl de carragenina al 1% para producir la inflamación. La bolsa está compuesta por un revestimiento de células que consiste principalmente a macrófagos (Tipo A) y fibroblastos (Tipo B), luego de 4 horas de inducida la inflamación se realiza una incisión en la zona de la bolsa de aire, se lava con PBS y se recupera el líquido producido en la zona en tubos falcon para la posterior centrifugación a 2000 rpm (Duarte, Vasko y Fehrenbacher, 2012).

Cabe señalar que las modificaciones de los métodos básicos de inflamación de la bolsa de aire, como la variación de las especies de roedores, el número y la secuencia de las inyecciones de aire y los puntos finales medidos (Duarte, Vasko y Fehrenbacher, 2012).

- **Medición leucocitaria**

Una vez centrifugado los tubos falcon se obtiene en el fondo los leucocitos y el sobrenadante las proteínas totales, se toma 10 µl del fluido y se lo diluyó con 90 µl del reactivo de Wright y se realiza conteo en una cámara de Neubauer con ayuda de un microscopio de cada bloque de glóbulos blancos.

- **Determinación de proteínas totales**

El reactivo Bradford se puede utilizar para determinar la concentración de proteínas. Para la establecer la curva de calibración se procedió con 5 µl de una muestra de proteína a concentraciones entre 0,02–1,34 mg/ml. Este ensayo se realiza en una placa de 96 pocillos, pudiendo analizar rápidamente múltiples muestras de proteínas totales. También es posible automatizar la determinación de proteínas con este ensayo de placa de 96 multipocillos (Anexo L) (Sigma Aldrich , p. 1-3).

1. Mezcle suavemente el reactivo Bradford en la botella y lleve a temperatura ambiente.
2. Preparar los estándares de proteínas en buffer que van desde 0,02–1,34 mg/ml utilizando un estándar BSA o un estándar de proteína equivalente.
3. Se agregó 5 µl de los estándares de proteínas para separar los pocillos en la placa de 96 pocillos. Para el blanco, se agregó 5 µl de buffer.
4. Se preparó las muestras desconocidas con una concentración aproximada entre 0,02–1,34 mg/ml.
5. A cada pocillo utilizado, se añadió 250 µl del reactivo Bradford Reagent y se mezcló en un agitador durante 30 segundos.
6. Dejamos incubar las muestras a temperatura ambiente durante 5-45 minutos. Entonces, se midió la absorbancia a 595 nm. El complejo proteico-teñido es estable hasta 60 minutos. La absorbancia de las muestras debe registrarse antes del límite de tiempo de 60 minutos y dentro de los 10 minutos entre sí.
7. Se trazó la absorbancia neta vs la concentración proteica de cada estándar.
8. Se determinó la concentración proteica de las muestras desconocidas comparando los valores netos A_{595} con la curva estándar (Sigma Aldrich [2019], p. 3).

2.18. Eutanasia de los ratones

Luego de haber culminado con cada uno de los métodos se les colocó a los ratones en una cuba con etér para eutanasiarlos, finalmente en una funda roja para su deposición final a cargo del profesional a cargo del bioterio.

2.19. Análisis de datos

Los resultados cuantitativos se expresaron como un error medio-estándar de la media. ANOVA fue utilizado seguido por la prueba de Dunett para comparar los grupos y controles de prueba o la prueba de Tukey para comparar múltiples medios con un 5% de probabilidad usando Graph Pad 8.2.1. Los valores de $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.

CAPÍTULO III

3. Resultados y discusiones

3.1. Control de calidad de la droga vegetal

Los resultados del control de calidad de la droga cruda se muestran en la siguiente tabla (4-3):

Tabla 4-3: Control de calidad de la droga vegetal

Parámetro %	<i>Aristeguietia glutinosa</i>	Valores de referencia Real Farmacopea Española 2002
Humedad	9,60%	<=14%
Cenizas Totales	8,87%	<=12%
Cenizas Insolubles en HCl	1,17%	<=5%
Cenizas solubles en H ₂ O	2,90%	<=7%

Elaborado por: José Andrade y Marco Murillo

3.1.1. Determinación de humedad

La humedad de las hojas de *Aristeguietia glutinosa* fue de 9,60%, indicando que el porcentaje de humedad se encuentra dentro de los valores establecidos por la Real Farmacopea Española del 2002 (Fuentes Paredes et al., 2008).

Los valores obtenidos de humedad en el estudio realizado por Cruz Ati de *Aristeguietia glutinosa* fueron de 9,80%, comparando con el presente estudio se observó que al usar el mismo método de pérdida de masa a través del secado en una estufa los valores se aproximan y casi coinciden en sus resultados (Cruz Ati, 2009, p. 97)

El contenido de humedad determinado asegura que los microorganismos y la actividad enzimática no causen degradación de los metabolitos secundarios, garantizando de esta forma la estabilidad de la materia vegetal en el transcurso de la investigación (Réfuba, Pany y Bombarda, 2018, p. 4).

3.1.2. *Contenido de cenizas totales*

En cuanto a las cenizas totales el resultado obtenido fue de 8,87%, valor que está dentro del parámetro establecido por la Real Farmacopea Española del 2002. Esto quiere decir que el resultado de este ensayo ofrece fiabilidad de uso de la *Aristeguietia glutinosa* en la investigación, ya que indica la ausencia de contaminación con materia inorgánica externa (minerales) durante la recolección de la planta.

En la investigación de Cruz Ati, el valor obtenido en su ensayo fue de 8,98%, lo cual se evidencia que se trabajó con el mismo método, por lo tanto los resultados van a ser casi parecidos (Cruz Ati, 2009, p. 97).

3.1.3. *Contenido de cenizas solubles en H₂O y cenizas insolubles en HCl*

En el contenido de cenizas insolubles en HCl fue de 1,17% y cenizas solubles en H₂O fue de 2,90%. Esto indica que el contenido de este tipo de cenizas, se encuentran dentro de los parámetros de calidad establecidos por la Real Farmacopea Española, demostrando así que las drogas vegetales no se encuentran contaminadas con materia inorgánica, además se asegura su uso en la investigación.

Cruz Ati, obtuvo valores parecidos a los de la presente investigación, los cuales fueron en cenizas insolubles en HCl de 1,17% y cenizas solubles en agua de 2,92%. Estos también cumplieron con las directrices de calidad establecidas por la Farmacopea Española.

3.2. Tamizaje fitoquímico

Los resultados del tamizaje fitoquímico se analizan de acuerdo a los siguientes parámetros, tabla (5-3)

Tabla 5-3: Referencias de análisis

(-)	Negativo
(+)	Baja evidencia
(++)	Evidencia
(+++)	Alta evidencia

Elaborado por: José Andrade y Marco Murillo

3.2.1. *Extracto Etanólico*

En la siguiente tabla (6-3) se muestra los resultados obtenidos en las pruebas:

Tabla 6-3: Extracto etanólico

Prueba Fitoquímica	Nombre del ensayo	Extracto Etanólico
Aceites y Grasas	SUDAN	-
Alcaloides	DRAGENDORFF	+++
Alcaloides	MAYER	+++
Alcaloides	WAGNER	+++
Cumarinas	HIDROXAMATO FÉRRICO PARA COUMARINAS	+
Quinonas	BORNTRAGER	-
Triterpenos y esteroides	LIEBERMANN-BURCHARD	++
Catequinas	CATEQUINAS	+
Azúcares reductores	FEHLING A-B	+
Taninos	Cloruro Férrico	+++

Elaborado por: José Andrade y Marco Murillo

Una vez realizadas las pruebas con el extracto etanólico, se ha determinado la presencia de los siguientes metabolitos secundarios, que son:

- Una alta presencia de alcaloides y taninos
- Existe presencia de triterpenos y esteroides
- Una baja evidencia de cumarinas, catequinas y azúcares reductores
- Y finalmente, los aceites y grasas y las quinonas no se presentan

3.2.2. Extracto Hexánico

En la siguiente tabla (7-3) se muestra los resultados de la prueba con el extracto hexánico:

Tabla 7-3: Extracto hexánico

Prueba Fitoquímica	Nombre del ensayo	Extracto Hexánico
Aceites y Grasas	SUDAN	+++
Alcaloides	DRAGENDORFF	+++
Alcaloides	MAYER	++
Alcaloides	WAGNER	+++
Cumarinas	HIDROXAMATO FÉRRICO PARA COUMARINAS	-
Quinonas	BORNTRAGER	-
Triterpenos y esteroides	LIEBERMANN- BURCHARD	++
Catequinas	CATEQUINAS	-
Azúcares reductores	FEHLING A-B	-
Taninos	TANINOS	-

Elaborado por: José Andrade y Marco Murillo

Una vez realizadas las pruebas con el extracto hexánico, se ha determinado la presencia de los siguientes metabolitos secundarios, que son:

- Una alta presencia de aceites y grasas; y alcaloides con las pruebas de Dragendorf y Wagner
- Existe presencia de alcaloides en la prueba de Mayer y; triterpenos y esteroides
- Finalmente, las cumarinas, quinonas, catequinas, azúcares reductores y taninos, no se presentan

3.2.3. *Extracto Diclorometano-metanol*

En la siguiente tabla (8-3) se muestra los resultados de la prueba con el extracto de Diclorometano-metanol:

Tabla 8-3: Extracto Diclorometano-metanol

Prueba Fitoquímica	Nombre del ensayo	Extracto Diclorometano- metanol
Aceites y Grasas	SUDAN	+

Alcaloides	DRAGENDORFF	++
Alcaloides	MAYER	++
Alcaloides	WAGNER	-
Cumarinas	HIDROXAMATO FÉRRICO PARA COUMARINAS	-
Quinonas	BORNTRAGER	-
Triterpenos y esteroides	LIEBERMANN- BURCHARD	+++
Catequinas	CATEQUINAS	-
Azúcares reductores	FEHLING A-B	-
Taninos	TANINOS	++

Elaborado por: José Andrade y Marco Murillo

Una vez realizadas las pruebas con el extracto diclorometano-metanol, se ha determinado la presencia de los siguientes metabolitos secundarios, que son:

- Una alta presencia de triterpenos y esteroides
- Existe presencia de alcaloides con las pruebas de Dragendorf y Mayer; y también de taninos
- Existe una baja evidencia de aceites y grasas
- Y finalmente, los alcaloides con la prueba de Wagner
- No se evidencia la presencia de cumarinas, quinonas, catequinas, y azúcares reductores.

Una vez realizadas las pruebas respectivas y según los resultados obtenidos, con los tres extractos se evidencia la presencia de diversos metabolitos secundarios entre ellos alcaloides, a quienes se les atribuye un efecto relajador de la musculatura lisa (Montes y Wilcomirsky, 1985).

3.3. Cuantificación de fenoles totales y flavonoides totales

El cálculo de fenoles totales se realizó mediante la ecuación de la recta $y = 0.0008x + 0.0133$, del estándar de ácido gálico, con un coeficiente de correlación de $R^2 = 0.9992$.

La concentración de fenoles totales de la *Aristeguietia glutinosa* se expresó de la siguiente manera (mg EAG/mg extracto seco) que significa, cantidad de mg equivalentes de ácido gálico por miligramos de extracto seco.

La cantidad de fenoles totales que se obtuvieron del extracto Diclorometano-metanol (1:1) de *Aristeguietia glutinosa* fue de 37.82 ± 0.007 mg EAG/10mg de extracto seco. Del extracto etanólico fue de 16.80 ± 0.002 mg EAG/10mg. Y del extracto hexánico fue de 8.98 ± 0.009 mg EAG/10mg.

Para terminar los flavonoides totales en la planta *Aristeguietia glutinosa*, se realizó del método espectrofotométrico basado en la formación de un complejo entre los flavonoides y el tricloruro de aluminio ($AlCl_3$), donde la reacción que provoca es que la solución de torne de un color rosado.

Se calculó los flavonoides totales mediante la ecuación de la recta $y=0.002x + 0.0056$, del estándar de quercetina con un coeficiente de correlación de $R^2= 0.999$.

La concentración de flavonoides totales de la *Aristeguietia glutinosa* se expresó de la siguiente manera (mg EQ/mg extracto seco) que significa, cantidad de mg equivalentes de quercetina por miligramos de extracto seco.

La cantidad de flavonoides totales que se obtuvieron del *extracto* Diclorometano metanol (1:1) de *Aristeguietia glutinosa* fue de 16.69 ± 0.031 mg EQ/10mg de *extracto* seco, extracto etanólico fue de 12.74 ± 0.045 mg EQ/10mg y el extracto hexánico fue de 12.10 ± 0.027 mg EQ/10mg.

Los resultados reflejaron que esta especie vegetal posee gran cantidad de fenoles y flavonoides totales, en especial con el extracto de Diclorometano metanol (1:1) de *Aristeguietia glutinosa*. Al no haber estudios previos sobre la cantidad de flavonoides o fenoles totales se buscó información con otras especies del mismo género, en la cual pudimos evidenciar que la cantidad de flavonoides y fenoles totales son también altas (Ionita et al., 2013).

3.4. Generación de la inflamación

Se seleccionó el extracto de diclorometano metanol de *Aristeguietia glutinosa* para realizar los ensayos biológicos *in vivo*, debido a la gran cantidad de flavonoides y fenoles totales que posee la planta.

3.4.1. Inducción y evaluación del Método de Edema Plantar con carragenina

Las mediciones en la evaluación de la actividad antiinflamatoria se realizaron con ayuda de un pie de rey digital, los resultados obtenidos antes y después de la administración de los tratamientos previa inducción de la inflamación se muestran a continuación. Ver tabla (9-3)

Tabla 9-3: Media de los resultados de la disminución de la inflamación

MEDIA DE LOS RESULTADOS DE LA DISMINUCIÓN DE LA INFLAMACIÓN							
	Medida 0H (mm)	Medida (mm) 1 H	Medida (mm) 2 H	Medida (mm) 3 H	Medida (mm) 4 H	Medida (mm) 5 H	Medida (mm) 6 H
Grupo 1 blanco- vehículo (tween 80 al 5%)	3,09	3,60	4,29	4,34	4,68	4,69	4,74
Grupo 2 CTR positivo (Diclofenaco 10 mg/kg)	3,24	4,25	4,17	3,81	3,69	3,54	3,45
Grupo 3 AGDCMMM 30 mg/kg	3,04	3,97	3,71	3,58	3,43	3,32	3,27
Grupo 4 AGDCMMM 100 mg/kg	3,11	4,09	3,82	3,60	3,52	3,42	3,35
Grupo 5 AGDCMMM 300 mg/kg	3,04	4,24	3,99	3,72	3,57	3,44	3,34

Elaborado por: José Andrade y Marco Murillo

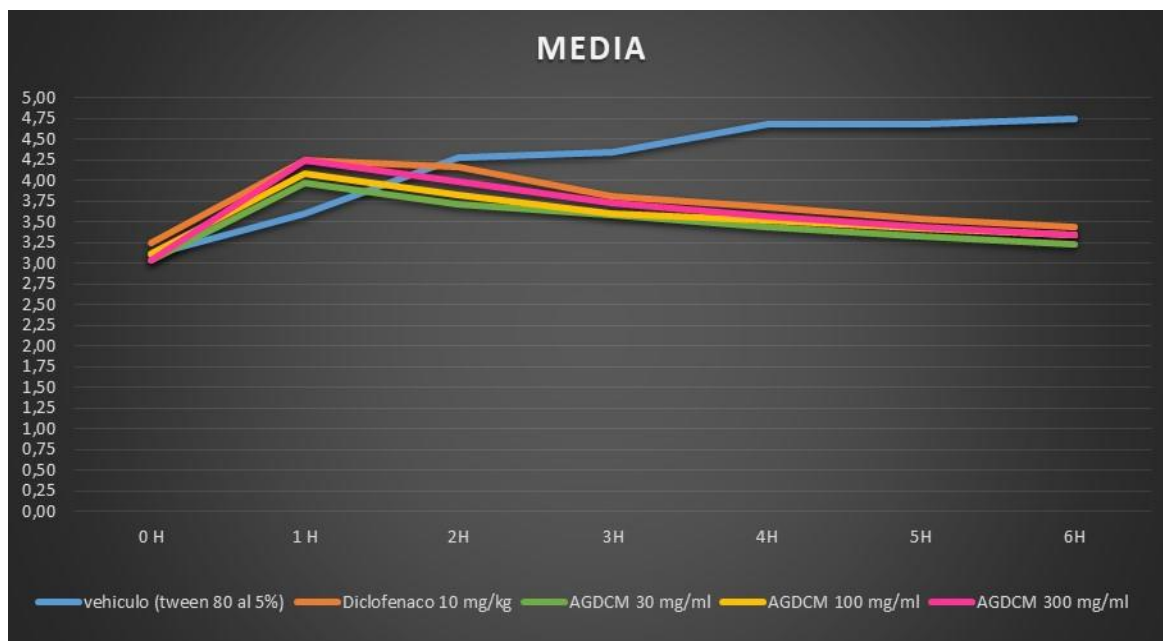


Gráfico 1-3: Media de la disminución de la inflamación

Elaborado por: José Andrade y Marco Murillo

Una vez aplicada la fórmula del porcentaje de inhibición, los resultados obtenidos se muestran en la tabla (10-3)

Tabla 10-3: Media y desviación media de inhibición

	Grupo blanco- vehículo (Tween 80 (5%))	Grupo CTR positivo (Diclofenaco 10 mg/kg)	Grupo <i>AGDCMM</i> 30 mg/Kg	Grupo <i>AGDCMM</i> 100 mg/Kg	Grupo <i>AGDCMM</i> 300 mg/Kg
MEDIA	100	12,83	13,46	14,40	17,95
SD	0	4,30	4,68	2,43	2,81

Elaborado por: José Andrade y Marco Murillo

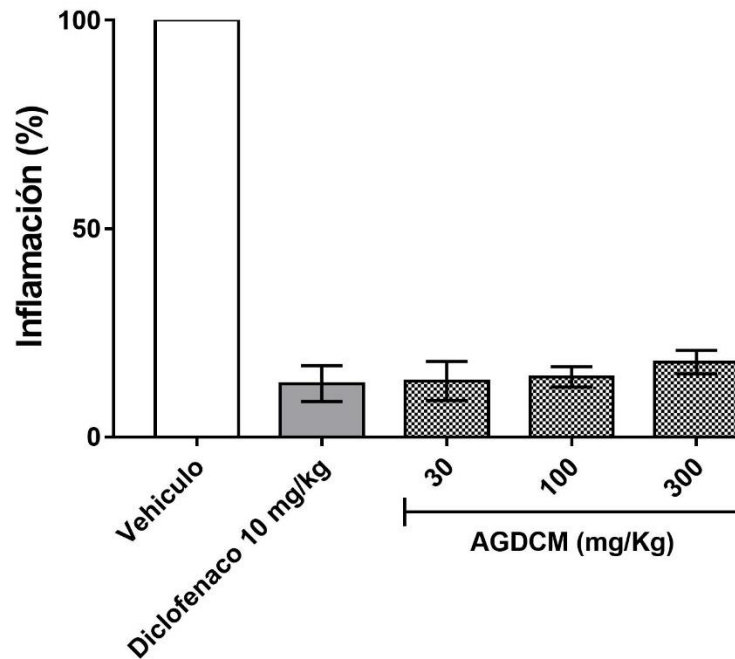


Gráfico 2-3: Porcentaje de inhibición

Elaborado por: José Andrade y Marco Murillo

Del gráfico (3-3) se puede observar que en el Grupo 1, donde se aplicó el vehículo Tween 80 al 5%, la inflamación se encuentra al 100% no se presentó ninguna inhibición de la inflamación. En los demás grupos se presenta una inhibición de la inflamación, siendo el de mayor relevancia en la muestra del Grupo 3 donde se aplicó *AGDCMM* 30mg/kg de peso corporal.

Los resultados que se obtuvieron del ensayo, se evaluaron estadísticamente mediante el Software Graph Pad Prism 8.2.1. Se aplicó el Test de ANOVA para establecer las diferencias en el porcentaje de inhibición de la inflamación entre las concentraciones extracto de todos los grupos experimentales.

Con un valor de $p = 0,9741$; rechazamos la hipótesis nula, existiendo una diferencia entre las medias. Evidenciando que la relación existente entre el Diclofenaco de 10mg/kg vs *AGDCMM* de 30 mg/kg, es no significativa, es decir que se podría administrar cualquiera de los dos tratamientos.

3.4.1.1. Fórmula Leucocitaria

En la fase aguda de la inflamación, plaquetas y células granulocíticas tales como células de basófilos / mastocitos, neutrófilos y eosinófilos se activan y, a su vez producen y liberan un número de mediadores solubles que estimulan y regulan la respuesta inflamatoria.

Basándonos en el hecho de el uso de las 3 R (reemplazo, reducción y refinamiento) ("What are the 3Rs National Centre for Replacement, Refinement and Reduction of Animals in Research. Retrieved August 14, 2013) y tratando de hacer un buen uso del animal se decidió realizar un análisis sanguíneo. El resultado que se presenta a continuación en los gráficos (4-3 y 5-3) se basan en nuestro control positivo por tanto no son conclusivos ya que no existen intervalos de referencia en nuestros biomodelos de experimentación.

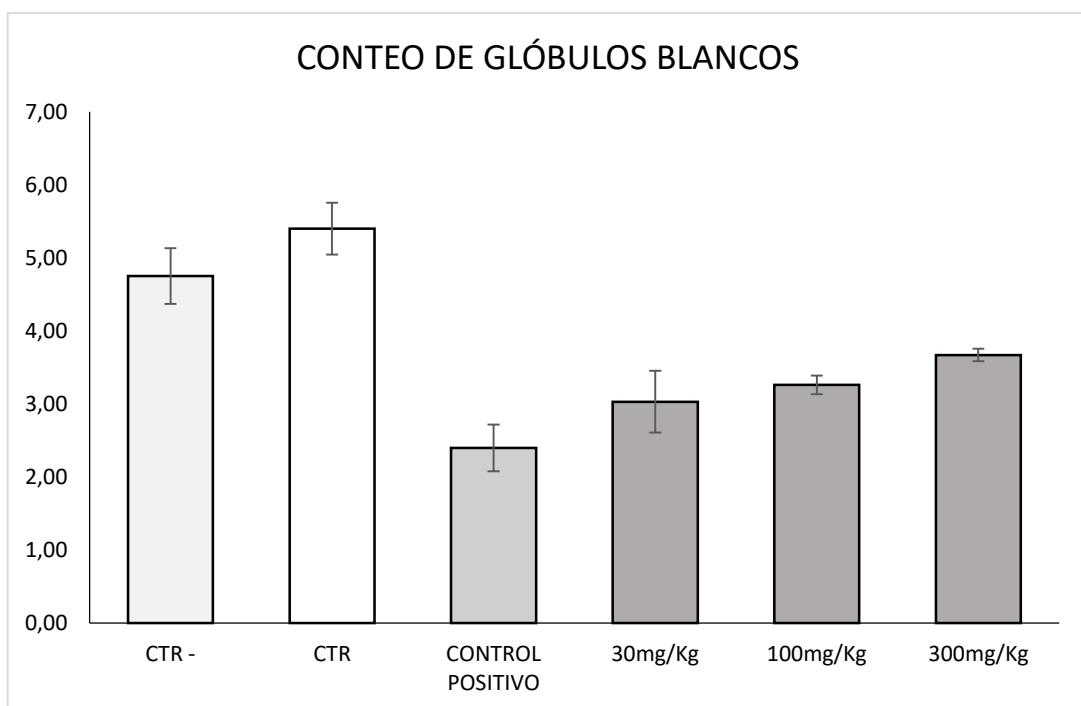


Gráfico 3-3: CONTEO DE GLÓBULOS BLANCOS

Elaborado por: José Andrade y Marco Murillo

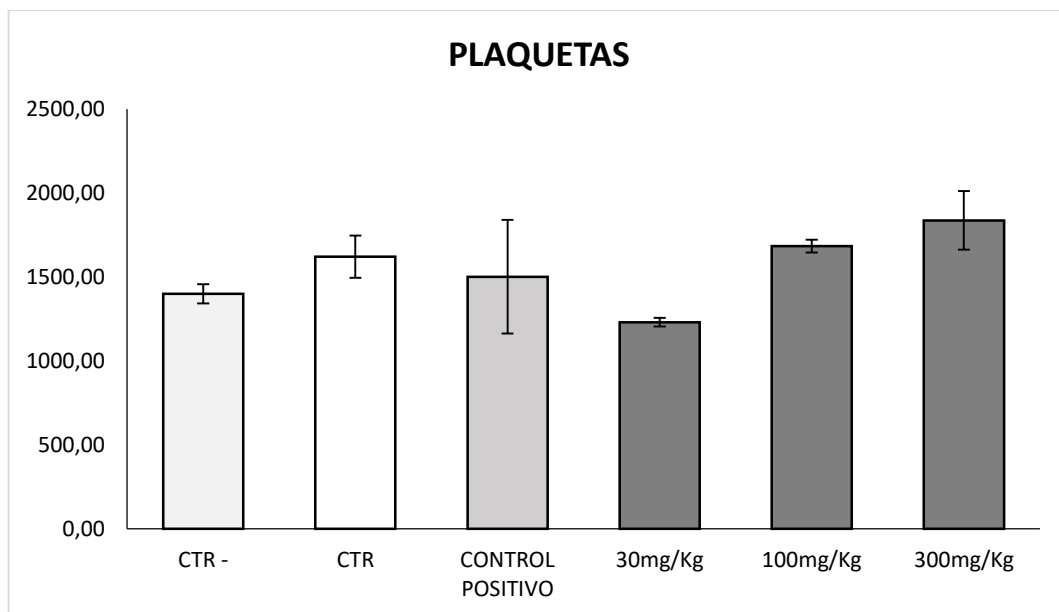


Gráfico 5-3: Plaquetas

Elaborado por: José Andrade y Marco Murillo

3.4.2. Inducción y evaluación de la inflamación por Air pouch

Este es otro método que se utilizó para determinar la actividad anti-inflamatoria. Primero se procedió a inyectar aire puro subcutáneamente en el área intraescapular de la parte posterior del ratón *Mus musculus* para provocar una bolsa de aire. La bolsa creada contiene un revestimiento de células, principalmente macrófagos (Tipo A) y fibroblastos (Tipo B), similar a la cavidad sinovial (Duarte, Vasko y Fehrenbacher, 2012, p. 1). La inyección de una solución de carragenina en la bolsa produce una reacción inflamatoria que se caracteriza por una infiltración de células, aumento de exudado, y una marcada producción de mediadores pro-inflamatorios, tales como las prostaglandinas, leucotrienos y citoquinas, así como componentes de la respuesta al estrés oxidativo (Vandooren et al., 2013). Por lo mencionado para determinar el contenido de proteínas totales se elaboró una curva de calibración utilizando el reactivo de Bradford y el suero de albumina bovina como estándar (Colyer y Walker 1996, p. 15), con las concentraciones especificadas en la tabla (11-3) y en el gráfico (6-3).

Tabla 11-3: Concentraciones-absorbancia

CONCENTRACIONES (ppm)	ABSORBANCIA
0	0,2389
0,02	0,2447
0,04	0,2542
0,06	0,2532

0,08	0,2625
0,1	0,2674
0,15	0,2933
0,2	0,3075
0,4	0,3738
0,8	0,4566
1,34	0,5544

Elaborado por: José Andrade y Marco Murillo

Se obtuvo una ecuación de la recta de $y = 0,2418x + 0,2486$, con un coeficiente de correlación de $R^2 = 0,982$ que indica una buena correlación entre las variables. Las muestras y los estándares se evaluaron 6 veces.

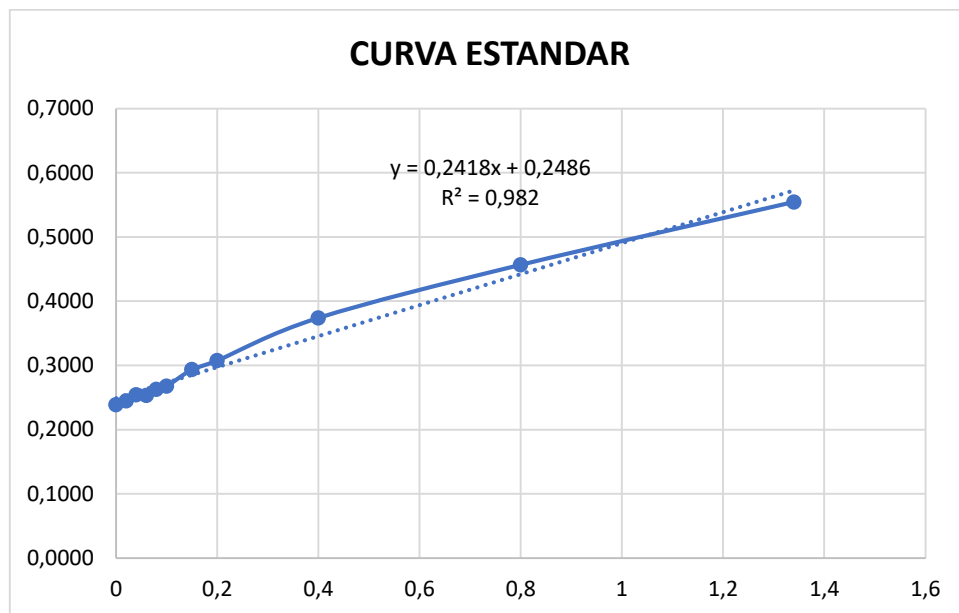


Gráfico 6-3: Curva Estándar

Elaborado por: José Andrade y Marco Murillo

3.4.2.1. Cuantificación de Proteínas Totales

Debido al proceso inflamatorio creado en el animal por la inyección de carragenina se decidió cuantificar el nivel de proteínas totales ya que este aumenta la concentración proteica (Colyer y Walker 1996).

Los resultados en la tabla (12-3), muestran que la concentración de 30mg/ml del *extracto* diclorometano metanol de *Aristeguietia glutinosa* reduce en mayor medida la inflamación en comparación de las otras concentraciones. Sin embargo, el CTR+ (diclofenaco) presenta una mayor reducción de inflamación.

Tabla 12-3: Proteínas Totales

	VEHICULO	CTR -	CTR +	30 mg/mL	100 mg/mL	300 mg/mL
MEDIA	0,4759	1,2426	0,6565	0,7600	0,8612	1,1965
SD	0,1130	0,1899	0,0859	0,1333	0,0819	0,0694

Elaborado por: José Andrade y Marco Murillo

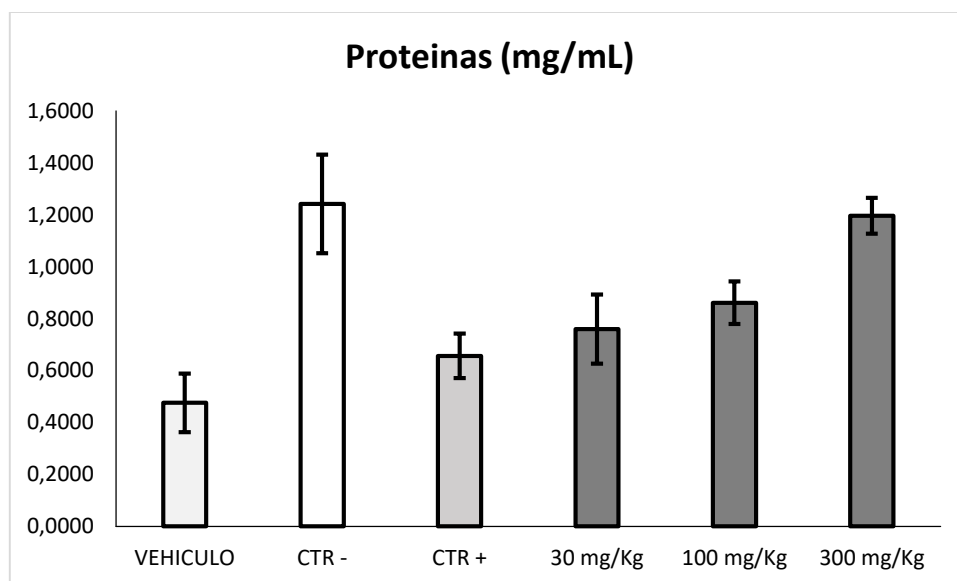


Gráfico 7-3: Proteínas Totales

Elaborado por: José Andrade y Marco Murillo

3.4.2.2. Infiltración leucocitaria

De igual manera, el conteo de glóbulos blancos son menores en el grupo de 30mg/Kg extracto a comparación de los otros grupos. Ver tabla (13-3)

Tabla 13-3: Infiltración leucocitaria

	BLANCO	CTR-	CTR +	30mg/Kg	100mg/Kg	300mg/Kg
MEDIA	5333	377200	149667	21000	68233	55250
SD	1800,74	35539,27	32036,44	6055,30	14524,58	15202,80

Elaborado por: José Andrade y Marco Mala

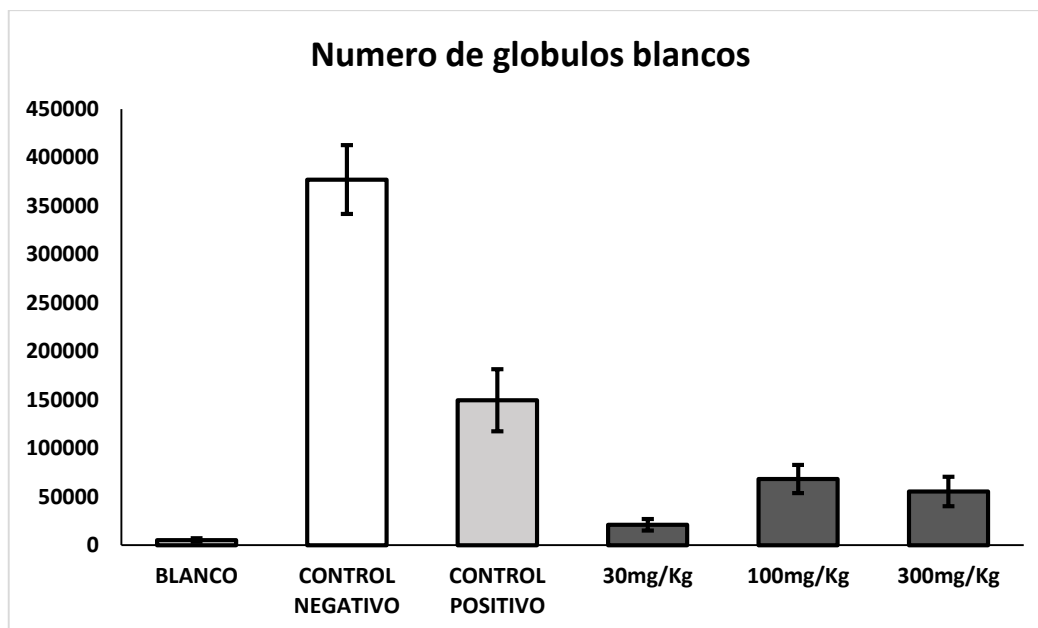


Gráfico 8-3: Infiltración leucocitaria

Elaborado por: José Andrade y Marco Murillo

Las técnicas para cuantificación *in vivo* usadas han permitido evidenciar el poder antiinflamatorio que posee el extracto de diclorometano-metanol en todas las dosis usadas, siendo la dosis de 30 mg/Kg la que presenta mayor inhibición. Al ser este el primer estudio sobre el poder antiinflamatorio de la planta no existe datos que puedan relacionar nuestros valores, sin embargo, varios estudios precedentes confirman el poder antiinflamatorio del extracto de diclorometano en diferentes especies de *Aristeguieta glutinosa* (Clavin et al. 2007) (Clavin et al., 2013) (Maas et al., 2011) (Shin et al., 2018). Así, un estudio realizado en argentina por Clavin, reporta el poder antiinflamatorio de diversas especies de *Eupatorium (Aristeguieta)*, en el cual se evidencian inhibiciones de inflamación de hasta el 94% (Clavin et al., 2013). De igual manera, Jong-Il Shin en un estudio reciente demostró el poder antiinflamatorio del extracto de *Eupatorium japonicum* mediante la inhibición de células fibroblásticas causantes de reumatitis (Shin et al., 2018).

El efecto antiinflamatorio mostrado por el extracto puede ser atribuido al gran contenido de flavonoides y fenoles totales ya que se ha demostrado en varios estudios los beneficios que poseen y entre ellos su poder antiinflamatorio (Zhang et al. 2011) (Croft 1998) (Hämäläinen et al. 2007).

CONCLUSIONES

- Mediante el tamizaje se establecieron los grupos fitoquímicos en los extractos de *Aristeguietia glutinosa*, el extracto de diclorometano metanol (1:1) presenta triterpenos, esteroides, taninos y alcaloides, el etanólico y hexánico tienen mayor presencia de alcaloides, mostrando una gran cantidad de metabolitos secundarios a los cuales se les puede atribuir sus diversas actividades.
- Se estableció mayor presencia de fenoles en el extracto de Diclorometano-metanol (1:1) de *Aristeguietia glutinosa* 37.82 ± 0.007 mg EAG/10mg y también mayor cantidad de flavonoides 16.69 ± 0.031 mg EQ/10mg, en relación al etanólico y hexánico, definiendo así para las pruebas in vivo la aplicación del extracto Diclorometano-metanol (1:1)
- Se evaluó la actividad antiinflamatoria *in vivo* del extrato de *Aristeguietia glutinosa* en los ratones *Mus musculus*, mediante las técnicas de edema plantar y air pouch usando carragenina como agente irritante, mediante las cuales se concluyó que el extracto de diclorometano metanol (1:1) presenta una inhibición de la inflamación en todas las dosis usadas, en especial la concentración de 30mg/kg de peso.

RECOMENDACIONES

- Se recomienda que exista mejor mantenimiento de las instalaciones del bioterio tanto como la correcta adquisición del alimento que se proporciona a los animales de experimentación, ya que en el proceso de ambientación fue muy difícil estandarizar el peso del ratón.
- Se recomienda que exista un listado de los reactivos disponibles y de los reactivos necesarios para realizar los ensayos pertinentes que se necesitan para las investigaciones. Además, se debería revisar también la disponibilidad de equipos y materiales necesarios en los laboratorios.
- Se debería contar con equipos como HPLC, cromatógrafo de gases y masa, que permitan la cuantificación más detallada de ciertos metabolitos secundarios, y poder realizar ensayos completos y más exactos.
- Se recomienda que se realicen más investigaciones respecto a las concentraciones del extracto de *Aristeguietia glutinosa*, ya que pudimos comprobar que en 30mg/kg ya existe un proceso antiinflamatorio y posiblemente exista también en concentraciones menores.

BIBLIOGRAFÍA

ALHAKMANI, F., KUMAR, S. y KHAN, S.A., 2013. Estimation Of Total Phenolic Content, In-Vitro Antioxidant And Anti-Inflammatory Activity Of Flowers Of *Moringa oleifera*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, vol. 3, no. 8, pp. 623-627. ISSN 22211691. DOI 10.1016/S2221-1691(13)60126-4.

AOUEY, B., SAMET, A.M., et al., 2016. Anti-Oxidant, Anti-Inflammatory, Analgesic And Antipyretic Activities Of Grapevine Leaf Extract (*Vitis vinifera*) In Mice And Identification Of Its Active Constituents By LC–MS/MS Analyses.

Biomedicine and Pharmacotherapy [en línea], vol. 84, pp. 1088-1098. ISSN 19506007. DOI 10.1016/j.biopha.2016.10.033. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2016.10.033>.

AYALA, S. y VÁSQUEZ, T., 2013. Evaluación De La Actividad Antifungica In Vitro Del Marco (*Ambrosia arborescens* Mill.) Y MATICO (*Aristeguietia Glutinosa* Lam.) Sobre Hongos Patógenos Causantes De La Dermatomicosis. *Tesis*, pp. 1-100.

BORDÉS GONZÁLEZ, R., MARTÍNEZ BELTRÁN, M., et al., 1994. El Proceso Inflamatorio. *Revista de Enfermería*, vol. 4, pp. 9-12.

BRAVO VELÁSQUEZ, E., 2014. *La Biodiversidad En El Ecuador*. Quito: s.n. ISBN 9780874216561.

BUESTAN ORELLANA, A. del R. y GUARACA MERCHAN, A.L., 2013. *Actividad Anti-Inflamatoria De Los Extractos De Plantas Medicinales Empleados En El Austro Ecuatoriano En El Modelo De Danio Rerio*. S.l.: UNIVERSIDAD DE CUENCA.

BUSTAMANTE DELGADO, S.E. , et al., 2015. Fundamentación Preclínica Del Uso Etnomédico De Matico (*Buddleja globosa* Hope). *Revista de Fitoterapia*, vol. 15, no. 1, pp. 37-51.

CLAVIN, M., GORZALCZANY, S., et al., 2007. Anti-Inflammatory Activity Of Flavonoids From *Eupatorium arnotianum*. *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 112, no. 3, pp. 585-589. ISSN 03788741. DOI 10.1016/j.jep.2007.04.007.

CLAVIN, M.L., REDKO, F., et al., 2013. In vivo anti-inflammatory activity and flavonoid

identification of medicinal Eupatorium species. *Pharmacognosy Journal*, vol. 5, no. 2, pp. 91-93. ISSN 09753575. DOI 10.1016/j.phcgj.2013.03.002.

COLYER, J. y WALKER, J.M., 1996. *Protein Handbook Edited by*. S.l.: s.n. ISBN 9781603272599.

CORDEIRO, K.W., FELIPE, J.L., et al., 2016. Anti-Inflammatory And Antinociceptive Activities Of Croton Urucurana Baillon Bark. *Journal Of Ethnopharmacology* [en línea], vol. 183, pp. 128-135. ISSN 18727573. DOI 10.1016/j.jep.2016.02.051. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2016.02.051>.

CROFT, K.D., 1998. The Chemistry And Biological Effects Of Flavonoids And Phenolic Acids. *Annals Of The New York Academy Of Sciences*, vol. 854, pp. 435-442. ISSN 00778923. DOI 10.1111/j.1749-6632.1998.tb09922.x.

CRUZ ATI, P.F., 2009. Elaboración Y Control De Calidad Del Gel Antimicótico De Manzanilla (*Matricaria chamomilla*), Matico (*Aristeguietia glutinosa*) y Marco (*Ambrosia arborescens*) para Neo-Fármaco. *Escuela Superior Politécnica de Chimborazo*, vol. 1, pp. 150.

CRUZ SUÁREZ, S.J., 2007. *Mas De 100 Plantas Medicinales*. primera. Las Palmas de Gran Canaria: La Obra Social de la Caja de Canarias.

CULQUI GUAMAN, X.C., 2017. Determinación De La Actividad Antiinflamatoria De La Planta *Clinopodium tomentosum* Mediante Inhibición De Edema Plantar Inducido Por Caragenina En Ratas *Rattus norvegicus*. [en línea], Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/6788>.

DUARTE, D.B., VASKO, M.R. y FEHRENBACHER, J.C., 2012. Models of Inflammation: Carrageenan Air Pouch. *Curr Protoc Pharmacol*, vol. 5, no. 6, pp. 1-12. DOI 10.1002/0471141755.ph0506s56.Models.

FERNÁNDEZ URQUIZA, F. y TORRES FUENTES, M., 2013. Inflamación Y Plantas Medicinales. *Organización panamericana de la salud*.

FRETES, F., 2010. Plantas Medicinales Y Aromáticas: Una Alternativa De Producción Comercial. *Agencia Del Gobierno De Los Estados Unidos Para El Desarrollo Internacional (USAID)*, pp. 7-60.

FUENTES PAREDES, F. de M., MENDOZA YANAVILCA, R.A., et al., 2008. *Guia De Manejo Y Cuidado De Animales De Laboratorio:Raton*. Lima: Ministerio de Salud. ISBN 9789972857690.

GABRIELA, A. y JARA, P., 2012. *Tesis De Grado* [en línea]. S.l.: ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/2596/1/56T00373.pdf>.

GARCÍA BACALLAO, L., ROJO DOMINGUEZ, D., et al., 2001. Plantas Con Propiedades Antioxidantes. *Revista Cubana De Investigaciones Biomedicas*, vol. 20, no. 3, pp. 231-236. ISSN 08640300.

GARCÍA BARRENO, P., 2008. Enfermedades De Origen Infecciosa. *Rev. R.Acad. Cienc.Exact.Fís.Nat. (Esp)*, vol. 102, pp. 91-159.

GARCÍA, M.A., AGUILAR, A., GUTIÉRREZ, M. , et al., 2016. Y Determinación De La Citotoxicidad De Extractos De Tempisque (*Sideroxylum capiri* PITTIER). *Biotecnia*, vol. XVIII, no. 3, pp. 3-8.

GUPTA, A.K., PARASAR, D., SAGAR, A. , et al., 2015. Analgesic And Anti-Inflammatory Properties Of Gelsolin In Acetic Acid Induced Writhing, Tail Immersion And Carrageenan Induced Paw Edema In Mice. *PLoS ONE*, vol. 10, no. 8. ISSN 19326203. DOI 10.1371/journal.pone.0135558.

HÄMÄLÄINEN, M., NIEMINEN, R. , et al.,2007. Anti-Inflammatory Effects Of Flavonoids: Genistein, Kaempferol, Quercetin, And Daidzein Inhibit Stat-1 And Nf-Kb Activations, Whereas Flavone, Isorhamnetin, Naringenin, And Pelargonidin Inhibit Only Nf-Kb Activation Along With Their Inhibitory Effect on i. *Mediators of Inflammation*, vol. 2007. ISSN 09629351. DOI 10.1155/2007/45673.

HORI, K. y SAKAJIRI, A., 2007. *LIBRO BLANCO De Los Herbolarios Y Las Plantas Medicinales*. Fundación. Madrid: s.n.

IONITA, L., GRIGORE, A., PIRVU, L. , et al., 2013. Pharmacological Activity Of An. , vol. 18, no. 6, pp. 8779-8786.

LUMITOS, 2019. Enciclopedia. *Quimica.es*.

MAAS, M., DETERS, A.M. y HENSEL, A., 2011. Anti-Inflammatory Activity Of *Eupatorium perfoliatum* L. Extracts, Eupafolin, And Dimeric Guaianolide Via Inos Inhibitory Activity And Modulation Of Inflammation-Related Cytokines And Chemokines. *Journal of Ethnopharmacology* [en línea], vol. 137, no. 1, pp. 371-381. ISSN 03788741. DOI 10.1016/j.jep.2011.05.040. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2011.05.040>.

MIRANDA, M. y CUELLAR, A., 2000. *Manual de Prácticas de Laboratorio. Farmacognosia y Productos Naturales*. La Habana: Editorial Félix Varela.

SOARES, L.A.L., BASSANI, V.L., et al., 2003. Total Flavonoid Determination for the Quality Control of Aqueous Extractives from *Phyllanthus niruri* L. *Acta Farmaceutica Bonaerense*, vol. 22, no. 3, pp. 203-207. ISSN 03262383.

MOHAMMED, M.S., OSMAN, W.J.A. , et al., 2014. Secondary Metabolites As Anti-Inflammatory Agents. *The Journal Of Phytopharmacology* [en línea], vol. 3, no. 4, pp. 275-285. Disponible en: www.phytopharmajournal.com.

MONTES, M. y WILCOMIRSKY, T., 1985. *Medicina Tradicional Chilena*. 1ra. Chile: Editorial de la Universidad de Concepción.

PAL, A., AL MAHMUD, Z., AKTER, et al., 2012. Evaluation Of Antinociceptive, Antidiarrheal And Antimicrobial Activities Of Leaf Extracts Of *Clerodendrum indicum*. *Pharmacognosy Journal*, vol. 4, no. 30, pp. 41-46. ISSN 09753575. DOI 10.5530/pj.2012.30.8.

PAREDES ATACHAO, M.E. y SOLANO MANYA, M.A., 2015. *Elaboración De Una Pomada A Base Del Extracto Seco De Piper Aduncum L . “ Matico ” Con Actividad Antiinflamatoria En Pacientes Del á. S.l.: UNIVERSIDAD PRIVADA ANTONIO GUILLERMO URRELO*.

RÉFUBA, C., PANY, I. y BOMBARDA, I., 2018. NIR Spectroscopy For The Quality Control Of *Moringa oleifera* (Lam.) Leaf Powders: Prediction Of Minerals, protein And Moisture Contents. *Food Chemistry*, vol. 261, pp. 311-321.

SARKER, M., CHANDRA DAS, S., KUMAR SAHA, S. , et al., 2012. Analgesic And Anti-Inflammatory Activities Of Flower Extracts Of **Punica granatum Linn.** (Punicaceae). *Pharmacognosy Journal*, vol. 4, no. 2, pp. 133-136. ISSN 2231-3354. DOI

10.732/JAPS.2012.24.08.

SHIN, J. II, JEON, Y.J., LEE, S. , et al., 2018. Apoptotic And Anti-Inflammatory Effects Of Eupatorium Japonicum Thunb. In Rheumatoid Arthritis Fibroblast-Like Synoviocytes. *BioMed Research International*, vol. 2018. ISSN 23146141. DOI 10.1155/2018/1383697.

SIGMA ALDRICH, [sin fecha]. Sigma Aldrich Technical bulletin: Bradford Reagent. , pp. 3-8.

VANDOOREN, J., BERGHMANS, et al., 2013. Intradermal Air Pouch Leukocytosis As An In Vivo Test For Nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*, vol. 8, pp. 4745-4755. ISSN 11782013. DOI 10.2147/IJN.S51628.

VEGA ROBLEDO, G.B., 2008. Inflamación. *Revista de la Facultad de Medicina de UNAM*, vol. 51, pp. 220-222.

VILLALBA HERRERA, E.W., 2014. Inflamación I. *Revista de Actualización Clínica*, vol. 43, pp. 2261-2265.

VINUEZA, D.R., LÓPEZ, E. , et al., 2017. Assessment Of Anti-Inflammatory Activity And Cytotoxicity Of Freeze Dried Hydroalcoholic Extract Of *Bidens andicola* On Isolated Neutrophils. *Asian Journal Of Pharmaceutical And Clinical Research*, vol. 10, no. 6, pp. 160-163. ISSN 24553891. DOI 10.22159/ajpcr.2017.v10i6.17574.

ZHANG, L., RAVIPATI, A.S., KOYYALAMUDI, et al., 2011. Antioxidant And Anti-Inflammatory Activities Of Selected Medicinal Plants Containing Phenolic And Flavonoid Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 59, no. 23, pp. 12361-12367. ISSN 00218561. DOI 10.1021/jf203146e.

BORDÉS GONZÁLEZ, R, et al., 2010. UNIVERSIDAD DE GRANADA. [EN LÍNEA] 18 DE FEBRERO DE 2010. [CITADO EL: 20 DE ABRIL DE 2019.] [HTTPS://RUIDERA.UCLM.ES/XMLUI/BITSTREAM/HANDLE/10578/266/1994-5.PDF?SEQUENCE=1](https://ruidera.uclm.es/xmlui/bitstream/handle/10578/266/1994-5.pdf?sequence=1).

HIDALGO, BRYAN. 2019. EVALUACIÓN DE LA SEGURIDAD IN VITRO DE LOS EXTRACTOS DE *OREOCALLIS GRANDIFLORA* (LAM.) R.BR. Y *PASSIFLORA MANICATA* (JUSS.) PERS., PARA SU POTENCIAL APLICACIÓN EN PROTECTORES. *DSPACE*. [EN

LÍNEA]

2019.

[HTTP://DSPACE.ESPOCH.EDU.EC/BITSTREAM/123456789/9707/1/56T00841.PDF](http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/9707/1/56T00841.pdf).

MIRANDA, M Y CUÉLLAR, A. 2001. *MANUAL DE PRÁCTICAS DE LABORATORIO: FARMACOGNOSIA Y PRODUCTOS NATURALES*. PRIMERA. LA HABANA : FÉLIZ VARELA, 2001.

ANEXOS

ANEXO A



HERBARIO POLITECNICA CHIMBORAZO (CHEP)
ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DEL CHIMBORAZO
Panamericana sur Km 1, fono: (03) 2 998-200 ext. 700123, jcaranqui@yahoo.com
Riobamba Ecuador

Ofc.No.065.CHEP.2019

14 de julio del 2019

Ing. Wilmer X. Tingo
DIRECTOR PROVINCIAL DE AMBIENTE
CHIMBORAZO

Reciba un atento y cordial saludo, por medio de la presente certifico que según el permiso Nro-015-IC-DPACH-MAE-2019 RENOVACION. Bajo responsabilidad de: Irvin Ricardo Tubón Usca con CI: 0604250357, se ha identificado la especie: *Aristeguietia glutinosa*, se revizó en los registros d el herbario y se archivará por el lapso de un año para los fines pertinentes. Es todo cuanto puedo decir en honor a la verdad y la interesada puedo usar el presente certificado como crea conveniente

Atte.


Ing- Jorge Caranqui Msc.
BOTANICO
HERBARIO ESPOCH



ANEXO B: Preparación de la muestra



ANEXO C: Determinación de la humedad



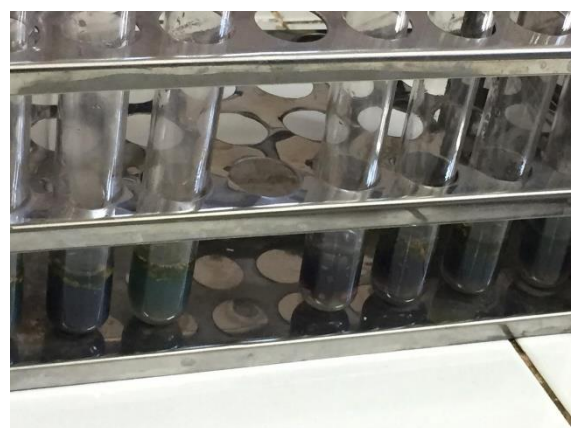
ANEXO D: Determinación de cenizas totales



ANEXO E: Obtención de extractos



ANEXO F: Tamizaje fitoquímico



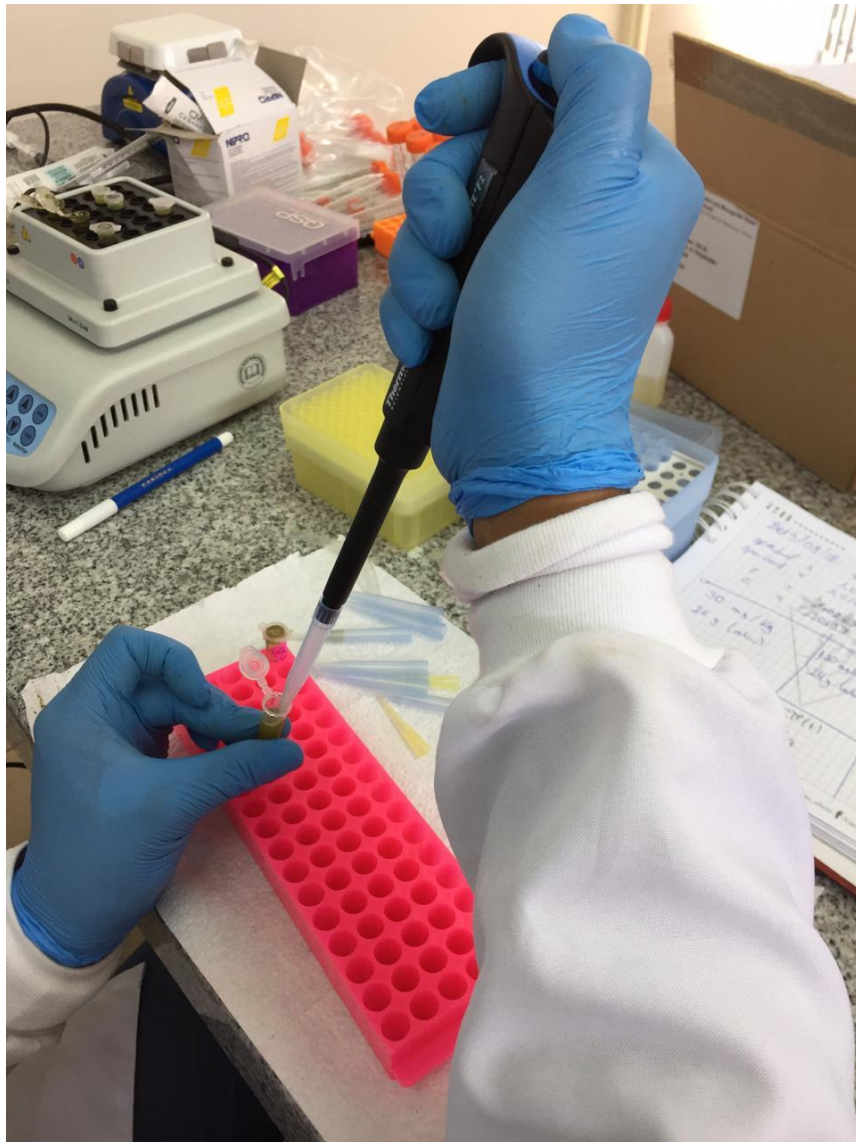
ANEXO G: Cuantificación de fenoles Totales



ANEXO H: Ambientación de los biomodelos en el bioterio



ANEXO I: Preparación del vehículo



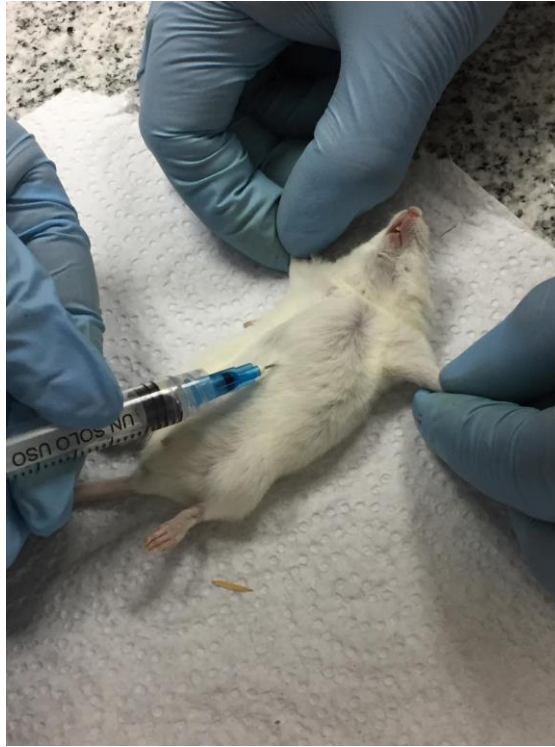
ANEXO J: Preparación y administración del extracto



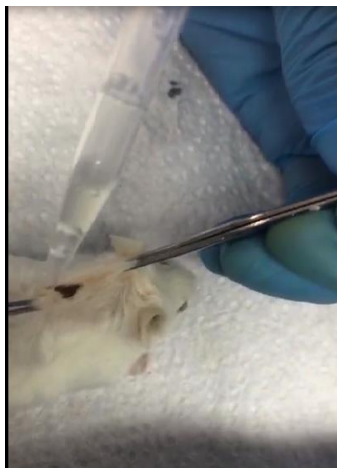
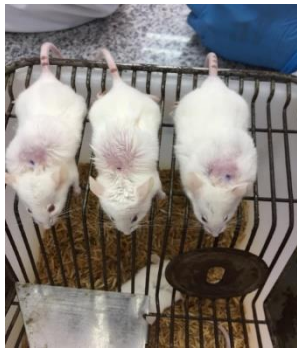
ANEXO K: Modelo de inflamación inducida por carragenina en la pata trasera del ratón
Mus musculus



ANEXO L: Biometría hemática



ANEXO M: Modelo de inflamación por air pouch



ANEXO N: Determinación de proteínas totales

